

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**ENDOGLINA SOLUBLE: MECANISMO DE GENERACIÓN Y  
FUNCIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES Y SU EFECTO EN EL  
REMODELADO VASCULAR**

Memoria presentada por

**EUNATE MARÍA GALLARDO VARA**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Bajo la dirección del Doctor

Carmelo Bernabéu Quirante

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**TESIS DOCTORAL**

**Endoglina soluble: mecanismo de generación y función en  
células endoteliales y su efecto en el remodelado vascular**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Eunate María Gallardo Vara**

**Director**

**Carmelo Bernabéu Quirante**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**ENDOGLINA SOLUBLE: MECANISMO DE GENERACIÓN Y  
FUNCIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES Y SU EFECTO EN EL  
REMODELADO VASCULAR**

Memoria presentada por

**EUNATE MARÍA GALLARDO VARA**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) bajo la dirección del  
doctor D. Carmelo Bernabéu Quirante.



Madrid, 2017

**VºBº DIRECTOR DE TESIS**

**VºBº DOCTORANDA**

**Dr. Carmelo Bernabéu Quirante**

**Eunate María Gallardo Vara**





### Este trabajo ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

**SAF2010-19222** del Ministerio de Ciencia e Innovación. (Plan nacional I+D). (2011-2013). *"Estudios moleculares sobre Endoglin y ALK1, dos componentes del receptor endotelial de TGF- $\beta$  implicados en la fisiopatología vascular"*. INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante

**2013-43421-R** del Ministerio de Economía y Competitividad. (Programa estatal de Investigación, desarrollo e innovación). (2014-2018). *"Análisis de un nuevo rol de endoglin en adhesión celular y su relevancia en la biología vascular"*. INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante

**ISCIII-CB06/07/0038**. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. (2006-2017). Unidad 707 del CIBERER. Investigador principal: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante

### Y gracias a las becas obtenidas:

Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) **BES-2011-049442** del Ministerio de Ciencia e Innovación. Asociada al proyecto SAF2010-19222. Investigador principal: Carmelo Bernabéu Quirante. *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)*.

Ayuda a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D españoles y extranjeros 2014 (**EEBB-I-15-10398**). (4 meses). Investigador principal: *Professor Helen Arthur. Institute of Genetic Medicine - Newcastle University. International Centre for Life*. (Reino Unido).

Ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D españoles y extranjeros 2013 (**EEBB-I-14-09020**). (4 meses). Investigador principal: *Professor Helen Arthur. Institute of Genetic Medicine - Newcastle University. International Centre for Life*. (Reino Unido).



D. CARMELO BERNABEU QUIRANTE, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA

Que Doña Eunáte María Gallardo Vara, Licenciada en Ciencias Biológicas (Biosanitarias) por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis Doctoral titulado “Endoglina soluble: mecanismo de generación y función en células endoteliales y su efecto en el remodelado vascular” y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid.

EL DIRECTOR,

Fdo. Dr. Carmelo Bernabeu Quirante



*A mis abuelos, por ellos y para ellos, que aunque algunos ya no están, los llevo siempre en mi corazón y hubiese deseado que estuviesen en este momento, a mi lado... Gracias por haberme enseñado tanto...*

*A mis padres, porque no hay palabras para describiros, me habeis apoyado de forma incondicional y habeis confiado en mí más que yo misma, siempre con ilusión y ganas. Os quiero.*



## **Agradecimientos**

*Gracias a todas las personas que de una forma u otra habéis hecho posible la realización de esta tesis, que me habéis ayudado y me habéis apoyado y por fin, este sueño se ha hecho realidad.*

*Gracias a mi director de tesis, Carmelo, por haber hecho este trabajo posible, especial mención a Luisa y Blanco, porque me habéis ayudado y apoyado mucho! Gracias a todos los que estais aún por el labo 108-109 y a los que no (Mikel, Lu, Eva, Vir, Luci, MariaJesús, Lidia, Carmen, Anacris, Elena...). De todos vosotros he aprendido muchísimo! Por supuesto mucha parte de esta tesis no hubiese sido posible sin la estancia en Newcastle, el labo de Helen, Thank you so much! Viví una experiencia inolvidable con todos vosotros, Helen, Simon, Esha, Darroch, Rachel. Y gracias al primer labo que me abrió las puertas en el CIB, Eduardo, Mar, Pilar, Leo, Mariano y a todos los servicios generales (confocal, citometría, proteómica) y las colaboraciones tanto del CIB, como de fuera (Salamanca, Praga...) ha sido un placer!*

*Quiero dar las gracias a todos que puedo decir con orgullo, amigos en mayúscula!, (los nombraré en la tesis escrita ;), a los que están más cerca y a los que no tanto, pero aún así siempre encontramos momentos para vernos y que habéis compartido tiempos de risas, lloros y locuras. Mil gracias por todo! Sois increíbles!*

*Gracias a mi familia, porque no tengo palabras, porque sois lo mejorcito que una puede tener a su lado, a mis padres, mis tios, mis primos, mis abuelos y a ti, Isra, porque como un día me dijiste, qué puedo decir, que no te haya dicho ya... Os quiero!*

*Como me gustaría extenderme más y todos os merecéis mucho mucho más, esta dedicatoria es muy general y los agradecimientos más extensos y personales están en la tesis escrita.*

*Gracias a todos de corazón,*

*Eunate*

***Los sueños parecen al principio imposibles,  
luego improbables, y cuando nos comprometemos, inevitables. –Ghandi-***





## INDICE DE CONTENIDOS

### INDICE DE FIGURAS ..... VI

### INDICE DE TABLAS ..... XI

### ABREVIATURAS ..... XIII

### ABSTRACT/RESUMEN ..... 3

## I. INTRODUCCIÓN ..... 13

1. Sistema vascular ..... 13
2. Angiogénesis y vasculogénesis ..... 14
3. Los vasos sanguíneos. Estructura, diferencias y función. .... 18
4. El endotelio. Características de las células endoteliales y función. .... 20
5. Señalización de TGF- $\beta$  y su relación con el endotelio. .... 22
  - 5.1. Superfamilia de TGF- $\beta$  ..... 22
  - 5.2 Señalización de TGF- $\beta$  dependiente de las Smads ..... 24
  - 5.3 Señalización de TGF- $\beta$  mediante la ruta no canónica ..... 28
6. Endoglin. Co-receptor de la ruta de señalización de TGF $\beta$ . .... 30
  - 6.1 Expresión y distribución celular..... 30
  - 6.2 Estructura y características bioquímicas ..... 31
  - 6.3. Función y señalización endotelial de endoglin ..... 34
  - 6.4. Isoformas de endoglin ..... 38
  - 6.5. Endoglin soluble ..... 41

6.6 Telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1 (HHT1). Enfermedad "rara" asociada a endoglin. ....	46
7. Metaloproteasas .....	51
7.1. MMP14 o MT1 (Metaloproteasa de matriz 14). ....	54
8. Familia KLF ( <i>Krüppel like factor</i> ) .....	56
8.1. KLF6 y su importante implicación en el endotelio. ....	57

## II. OBJETIVOS..... 61

## III. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 65

1. Cultivos celulares.....	65
2. Ensayos de migración celular y angiogénesis.....	66
2.1 Ensayo de migración celular mediante daño endotelial <i>in vitro</i> . ....	66
2.2 Ensayo de formación de tubos sobre Matrigel. ....	67
3. Medida de proliferación mediante la sonda CFSE. ....	67
4. ELISA. ....	68
5. Detección de proteínas celulares mediante inmunofluorescencia.....	69
6. Detección de proteínas celulares mediante citometría de flujo.....	70
7. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del promotor del gen <i>MMP14</i> . ....	71
8. Medida de la actividad de metaloproteinasas mediante un sustrato fluorogénico. 72	
9. Modelo de lesión mecánica del endotelio <i>in vivo</i> en ratones <i>klf6<sup>+/-</sup></i> y <i>WT (klf6<sup>+/+</sup>)</i> ..	72
10. Detección de proteínas en tejido mediante técnicas de inmunohistoquímica. ....	73
11. Análisis de expresión de RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real ( <i>qRT-PCR</i> ). ....	74
12. Inmunoprecipitación de proteínas (IP). ....	76
13. Electroforesis e inmunodetección de proteínas ( <i>Western Blot</i> ).....	77

14.	Inmunoprecipitación de cromatina ( <i>CHIP</i> ).....	78
15.	Vectores de expresión y ensayos de transfección o nucleofección y de actividad reportera. ....	79
16.	Ensayos de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia pequeño. ....	82
17.	“Plataformas” de análisis de proteínas ( <i>Arrays</i> proteicos).....	83
18.	Cuantificación proteica con marcaje isobárico ( <i>iTraq</i> ) y posterior análisis LC-MS/MS.....	84
19.	Línea celular inducible-KO endotelial de pulmón ( <i>MLEC2 Eng<sup>FL/FL</sup>;ROSA-CRE<sup>ERT</sup>;Immortal</i> ).....	86
20.	Modelo murino inducible KO para el gen <i>Eng</i> , o “HHT1” ( <i>ENG<sup>2FL/2FL</sup> VE-CadCRE<sup>ERT2</sup></i> ) y tratamiento intra-ocular.....	88
21.	Genotipado de los ratones.....	89
22.	Extracción, tinción y análisis de las retinas neonatales de ratón como modelo angiogénico. ....	91
22.1	Aislamiento y montaje de las retinas .....	91
22.2	Marcaje por inmunofluorescencia de la vasculatura de las retinas.....	91
22.3	Análisis estructural de la vasculatura de las retinas.....	92
23.	Aspectos legales (Experimentación animal). ....	93
24.	Estadística. ....	94
1.	Efecto del daño endotelial sobre la expresión de endoglina y MMP14 de membrana y la liberación de endoglina soluble (solEng) al medio. ....	99
1.1	La expresión de endoglina y MMP14 aumentan durante el daño endotelial.....	99
1.2	La herida endotelial induce la co-localización a nivel de membrana de endoglina y MMP14 y como consecuencia se libera solEng al medio extracelular.....	103
1.3	El factor de transcripción KLF6 incrementa la expresión de MMP14 tras el daño endotelial.....	108

1.4 Los ratones heterocigotos <i>klf6</i> <sup>+/-</sup> expresan menos niveles de MMP14 tras el daño endotelial.....	114
1.5 El gen <i>MMP14</i> es una diana transcripcional del factor KLF6 .....	116
1.6 KLF6 interacciona con la secuencia promotora del gen <i>MMP14</i> (-1544/+247) en células endoteliales <i>in vivo</i> . .....	117
1.7 KLF6 transactiva al promotor de <i>MMP14</i> en células endoteliales y las variantes KLF6 de <i>splicing</i> antagonizan esta acción.....	121
1.8 KLF6 regula, además, la expresión de otros genes como <i>IL-6</i> en células endoteliales. ....	124
2. Efecto de la endoglina soluble (solEng) sobre proteínas y genes implicados en angiogénesis. ....	126
2.1 Altos niveles de solEng reducen la formación de tubos y disminuyen la migración endotelial y la angiogénesis. ....	126
2.2 La solEng afecta a la expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis en HUVECs. ....	129
2.3. La solEng aumenta los niveles de BMP4 .....	135
2.4 La solEng actúa sobre la ruta de señalización de TGF- $\beta$ y otros genes o proteínas relacionados con la angiogénesis y procesos inflamatorios. ....	137
3. Efecto de endoglina soluble sobre las proteínas angiogénicas en células endoteliales <i>iKO</i> para <i>Eng</i> y sobre la generación de malformaciones arteriovenosas durante la neovascularización de retina en ratones <i>Eng</i> <sup>fl/fl</sup> (HHT1). ....	141
3.1 Efecto de solEng sobre células endoteliales de pulmón de ratón con supresión inducible del gen <i>Eng</i> (MLEC- <i>iKOE</i> ng o MLEC2). ....	141
3.2 Efecto de solEng sobre las malformaciones arteriovenosas (MAV) producidas en el modelo murino HHT1 ( <i>Eng-iKO</i> ) de neovascularización de retina. ....	149
<b>IV.DISCUSIÓN. ....</b>	<b>165</b>

1. Efecto del daño endotelial sobre la regulación de la expresión en la membrana celular de endoglina y la metaloproteinasa MMP14, así como la liberación de endoglina soluble. ....	165
2. Análisis descriptivo del efecto <i>in vitro</i> de endoglina soluble sobre proteínas y genes implicados en angiogénesis.....	172
3. Efecto de endoglina soluble sobre las malformaciones arteriovenosas producidas en retinas de un modelo murino de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1....	177
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
<b>VI.BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>191</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>223</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema básico de Vasculogénesis y Angiogénesis.....	17
Figura 2. Diferencia estructural entre arteria y vena del sistema vascular humano. ....	19
Figura 3. Especificidad de los ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$ y combinaciones heteroméricas de sus receptores.....	25
Figura 4. Esquema general de señalización de TGF- $\beta$ desde la membrana hasta el núcleo celular.....	27
Figura 5. Esquema básico de señalización de TGF- $\beta$ mediante las rutas no canónicas. ...	29
Figura 6. Esquema de la estructura del dímero de endogлина.....	34
Figura 7. Regulación general de la angiogénesis. ....	36
Figura 8. Mecanismo de procesamiento alternativo que da lugar a las dos isoformas de Endogлина.....	39
Figura 9. Mecanismo de corte de endogлина y estructura tridimensional de la región extracelular. ....	42
Figura 10. Modelo hipotético de generación de endogлина soluble en la homeostasis vascular. ....	45
Figura 11. Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) y sintomatología clínica asociada. ....	47
Figura 12. Hipótesis de "los tres eventos" de formación de malformaciones arteriovenosas en HHT. ....	48
Figura 13. Malformaciones arteriovenosas que se observan en retinas neonatales de ratones inducibles <i>KO</i> para los genes <i>Eng</i> o <i>Alk1</i> específicos de la célula endotelial.....	49
Figura 14. Esquema general de implicación de las metaloproteasas en diversas enfermedades.....	53
Figura 15. Estructuras esquemáticas de la metaloproteasa MMP14 o MT1.....	55

Figura 16. Representación esquemática de la estructura de la proteína KLF6. ....	57
Figura 17. Imágenes de los cultivos celulares descritos. ....	65
Figura 18. Esquema general del sistema de inmunodetección de proteínas mediante ELISA. ....	69
Figura 19. Esquema general del método seguido para el marcaje isobárico del secretoma de las células HUVECs tratadas o no con solEng durante 24h. ....	86
Figura 20. Esquema del modelo genético de células endoteliales de pulmón de ratón, MLEC2, inducibles KO para el gen de <i>Eng</i> y foto del cultivo a 10 aumentos. ....	87
Figura 21. Esquema del protocolo general seguido para inducir la represión del gen de <i>Eng</i> y posterior tratamiento de las células MLEC2. ....	87
Figura 22. Esquema del modelo murino genético inducible KO para <i>Eng</i> en células endoteliales. ....	89
Figura 23. Esquema del protocolo general seguido para inducir la represión del gen de <i>Eng</i> en el modelo murino <i>Eng</i> <sup>2fl/2fl</sup> <i>VECad-Cre</i> <sup>ERT2</sup> . ....	89
Figura 24: La migración celular y no la proliferación, contribuye a la reparación de la herida después del daño endotelial. ....	100
Figura 25: Los niveles de transcritos de <i>ENG</i> y <i>MMP14</i> aumentan en las horas centrales del daño endotelial <i>in vitro</i> . ....	101
Figura 26: La expresión proteica de <i>ENG</i> y <i>MMP14</i> aumentan en la membrana de HUVECs sometidas a un daño endotelial <i>in vitro</i> . ....	102
Figura 27 (Página siguiente): <i>ENG</i> y <i>MMP14</i> co-localizan a nivel de membrana en las HUVECs durante el daño endotelial <i>in vitro</i> . ....	104
Figura 28: La endoglina soluble se secreta al medio durante el cierre de herida endotelial. ....	106
Figura 29 (Página anterior): El silenciamiento génico de <i>MMP14</i> reduce la migración durante el cierre de herida endotelial y disminuye los niveles de solEng liberada al medio. ....	108



Figura 30: El factor de transcripción KLF6 aumenta en las etapas iniciales durante el cierre de herida.....	108
Figura 31: El silenciamiento de KLF6 disminuye la expresión génica y proteica de MMP14 y endoglina durante el cierre de herida endotelial .....	109
Figura 32 (Página siguiente): El silenciamiento de KLF6 disminuye la co-localización de endoglina y MMP14 así como la secreción de solEng al medio durante el daño endotelial. ....	110
Figura 33: Coinmunoprecipitación de endoglina y MMP14 tras silenciar o sobreexpresar KLF6 en HUVECs durante el daño endotelial. ....	112
Figura 34: Efecto del silenciamiento de KLF6 en HUVECs sobre la migración durante el proceso de cierre de herida endotelial. ....	113
Figura 35: La expresión de MMP14 es regulada por KLF6 y aumenta en la capa neoíntima de las arterias femorales de ratón sometidas a daño mecánico. ....	115
Figura 36: La sobreexpresión de KLF6 aumenta los niveles del transcrito de MMP14 y como consecuencia el aumento de la liberación de solEng al medio.....	116
Figura 37 (Página siguiente): Análisis <i>in silico</i> de los motivos probables de unión de <i>KLF6</i> al promotor de <i>MMP14</i> .....	117
Figura 38: Análisis <i>in silico</i> de los dominios ricos en GC en la secuencia -1544/+247 del promotor de <i>MMP14</i> .....	119
Figura 39: El factor de transcripción KLF6 endógeno se une al promotor proximal de <i>MMP14</i> en células endoteliales. ....	120
Figura 40: KLF6 transactiva al promotor de <i>MMP14</i> .....	122
Figura 41: Las variantes de <i>splicing</i> alternativo de KLF6 disminuyen la activación del promotor <i>MMP14</i> .....	123
Figura 42: Los niveles de IL6 se inducen por KLF6 durante el daño endotelial siguiendo una cinética similar a la de solEng. ....	125
Figura 43: Inhibición de formación de tubos por el tratamiento con solEng. ....	127
Figura 44: La solEng inhibe la migración de células HUVECs.....	128

Figura 45 (Página anterior): Análisis de los niveles de proteínas secretadas tras el tratamiento de células endoteliales con solEng.....	131
Figura 46: Diagramas de Venn comparando las proteínas angiogénicas aumentadas o disminuidas en presencia de solEng. ....	132
Figura 47: Identificación por iTRAQ de las proteínas diferencialmente secretadas por HUVECs en presencia de solEng. ....	134
Figura 48: Expresión de BMP4 en respuesta al tratamiento con solEng <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . ....	136
Figura 49: Efecto de solEng sobre los niveles de mRNA de componentes de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ en HUVECs. ....	138
Figura 50: La solEng activa la ruta pro-inflamatoria STAT3-IL6 y NFkB y disminuye la expresión de la metaloproteasa MMP14 durante la migración en HUVECs. ....	140
Figura 51: Inhibición de la expresión de endoglina en células MLEC2. ....	142
Figura 52: Membranas representativas del experimento <i>dotblot</i> para analizar proteínas angiogénicas en el sobrenadante de c-MLEC2 y KO-MLEC2 tratadas o no con solEng...	143
Figura 53: Diagramas de Venn donde se agrupan las proteínas que presentan expresión diferencial tras comparar las ratios de KO-MLEC2/c-MLEC2 y KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2. ....	145
Figura 54: Diagrama de Venn agrupando las proteínas que presentan expresión diferencial entre los genotipos tratados o no con solEng (KO-MLEC2+solEng/KO-MLEC2 y c-MLEC2+solEng/c-MLEC2). ....	147
Figura 55 (Página anterior): Diagrama de Venn agrupando las proteínas que presentan expresión diferencial entre ambos genotipos tratados con solEng y los genotipos sin tratar (KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2+solEng y KO-MLEC2/c-MLEC2). ....	149
Figura 56: Genotipado del modelo murino $Eng^{2fl/2fl} VE-Cre^{ERT2}$ mediante la detección de Cre-recombinasa y Miogenina ( <i>Myo</i> ).....	149
Figura 57: Comparación de los dos tipos de retina de nuestro modelo animal con genotipo $Engfl/fl VECre$ ( <i>Eng-KO</i> ) y $Engfl/fl$ ( <i>WT</i> ). ....	151

Figura 58: Expresión de Isolectina y Endoglina en vasculatura de retinas <i>WT</i> , <i>WT</i> tratadas con solEng, <i>Eng-KO</i> y <i>Eng-KO</i> tratadas con solEng. ....	153
Figura 59: Expresión de Isolectina y $\alpha$ -SMA en vasculatura de retinas <i>WT</i> , <i>WT</i> tratadas con solEng, <i>Eng-KO</i> y <i>Eng-KO</i> tratadas con solEng. ....	154
Figura 60: Intensidad de los marcadores vasculares Isolectina, Endoglina y SMA en la red vascular comparando genotipos y tratamientos entre sí. ....	155
Figura 61: Porcentaje de migración del plexo vascular. ....	156
Figura 62: Anchura y longitud promedio de Venas y Arterias comparando genotipos y tratamientos entre sí. ....	157
Figura 63: Promedio de uniones capilares y número de ramificaciones comparando genotipos y tratamientos entre sí. ....	158
Figura 64: Densidad vascular, resultado del análisis de las áreas ocupadas por los vasos comparando genotipos y tratamientos entre sí. ....	159
Figura 65 (Página anterior): Anchura, longitud y expresión de Isolectina, endoglina y SMA en las MAV. ....	161
Figura 66: Efecto de la solEng sobre el área ocupada y número de MAV en retinas <i>Eng-KO</i> . ....	162
Figura 67. Modelo hipotético de la regulación de KLF6 durante el daño vascular. ....	171
Figura 68. Modelo hipotético de acción bifásica de endoglina soluble a lo largo de las distintas fases del remodelado vascular. ....	176
Figura 69. Modelo hipotético de actuación de endoglina soluble cuando endoglina de membrana está o no presente en la célula endotelial. ....	184

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 (Página anterior). Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la amplificación por PCR cuantitativa. ....	76
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos humanos marcados con FAM utilizados en la amplificación por PCR cuantitativa. ....	76
Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR posterior a la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). ....	79
Tabla 4: Vectores de expresión y vectores reporteros empleados para los ensayos de transfección y nucleofección. ....	82
Tabla 5: Descripción de los cebadores utilizados para el genotipado del modelo animal. ....	90
Tabla 6. Anticuerpos y condiciones utilizados para la tinción de las retinas por inmunofluorescencia. ....	92
Tabla 7. Líneas y cultivos primarios celulares utilizados y nombrados a lo largo de esta tesis ....	95
Tabla 8: Efecto de endoglina soluble sobre distintos parámetros del fenotipo de retinas <i>Eng-KO</i> . ....	181



## ABREVIATURAS

**aa:** Aminoácidos

**Ac:** Anticuerpo

**ACN:** Acetonitrilo

**ACVRL/ALK1:** Gen / proteína ALK-1 (*Activin A receptor type II-like1*)

**BCA:** Ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid*)

**BMPs:** Proteínas morfogenéticas óseas (*Bone Morphogenetic Proteins*)

**BMPRs:** Receptores específicos de BMPs (*Bone Morphogenetic Protein Receptors*)

**BSA:** Albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario a la hebra de RNA (*Complementary DNA*)

**CF:** Libre de portador (*Carrier Free*)

**CFSE:** Carboxifluoresceína, colorante fluorescente (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*)

**ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin ImmunoPrecipitation*)

**COX-2:** Ciclooxygenasa 2

**CT:** Citoplasmático

**DAB:** Diaminobencidina

**DAPI:** 4',6'-diamino-2-fenilindol

**qRT-PCR:** Retrotranscripción cuantitativa del mRNA a cDNA seguida de reacción en cadena de la polimerasa del cDNA (*quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*)

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxi-ribonucleico (*Desoxyribonucleic Acid*)

**DTT:** Ditioneitol

**EC:** Extracelular

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

**ENG/Eng:** Gen/Proteína de Endogлина

**EngL:** Isoforma larga de Endogлина

**EngS:** Isoforma corta de Endogлина

**eNOS (NOS3):** Óxido nítrico sintasa endotelial (*endotelial Nitric Oxide Synthase*)

**ESM:** Error estándar de la media

**FAM:** 6-carboxi-fluoresceína

**FBS:** Suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)

**FL:** Forma Larga (*Full Length*)

**GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

**HEK293T:** Línea celular humana epitelial embrionaria de riñón inmortalizada con antígeno T (*Human Embryonic Kidney Cell Line 293T*)

**HHT:** Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (*Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*)

**HMEC-1:** Línea celular inmortalizada derivada de endotelio microvascular humano (*Human Microvascular Endothelial Cell line-1*)

**HRP:** Peroxidasa de rábano picante (*Horseradish Peroxidase*)

**HUVEC:** Células endoteliales derivadas de vena de cordón umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

**Id1:** Inhibidor de diferenciación 1

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IL:** Interleuquina

**kDa:** KiloDalton

**KLF:** Factor similar a Krüppel (*Krüppel Like Factor*)

**KO:** Ratón nulo para un gen determinado (*Knock Out mouse*)

**LC-MS/MS:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

**m/z:** relación masa/carga

**MAV:** Malformaciones arteriovenosas

**Merge:** Mezcla o fusión, utilizado para hacer referencia a imágenes del confocal que representan la fusión de dos o más canales de detección

**MLECs:** Células endoteliales de pulmón de ratón (*Mouse Lung Endothelial Cells*). MLEC1 (cultivo primario); MLEC2 (línea celular o cultivo primario inmortalizado).

**MMPs:** Metaloproteinasas de matriz (*Matrix Metalloproteinases*)

**MMP14/MT1-MMP:** Metaloproteinasa de matriz 14 / Metaloproteinasa de matriz de membrana tipo 1. (*Matrix metalloproteinase 14/Membrane-type-1 matrix metalloproteinase*)

**mRNA:** Ácido Ribonucleico mensajero (*messenger RNA*)

**NF-κB:** Factor nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

**ORF:** Marco de lectura abierto en el gen (*Open Reading Frame*)

**PAI-1:** Inhibidor del activador de plasminógeno 1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*)

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)

**PFA:** Paraformaldehído

**RLU:** Unidades relativas de luciferasa (*Relative Luciferase Units*)

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RNA:** Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

**R-Smad:** Smad regulada por receptor

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

**siRNA:** Ácido ribonucleico de interferencia pequeño con conformación lineal (*Small Interfering RNA*)

**siScrambled-RNA:** Ácido ribonucleico de interferencia pequeño que no afecta a nuestro gen diana, con conformación lineal y utilizado como control negativo (*Small Interfering RNA*)

**Smad:** Resultado de la conjunción de los nombres de las proteínas Sma (*Caenorhabditis elegans*) y Mad (*Drosophila melanogaster*)

**solEng:** Endoglina soluble

**Sp1:** Proteína de especificidad 1 (*Specificity protein 1*)

**Splicing:** Proceso de corte y empalme o ajuste



**STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)

**TAE:** Tampón Tris-Acetato EDTA

**TBS:** Tampón Tris salino (*Tris Buffer Saline*)

**TBS-T:** TBS-Tween20

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor  $\beta$* )

**TIMP:** Inhibidor de metaloproteinasas de tejido (*Tissue Inhibitor of MetalloProteinases*)

**TM:** Transmembrana

**TMB:** TetraMetilBenzidina

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

**uPA:** Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Urokinase-type Plasminogen Activator*)

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

**WB:** Inmunodetección de proteínas (*Western Blot*)

**WT:** Genotipo salvaje de un ratón (*Wild Type mouse*)

**ZP:** Zona Pelúcida

# ***ABSTRACT/RESUMEN***

*En pocas palabras... lo que dura una  
taza de café*



## ABSTRACT/RESUMEN

### **Introduction**

Endoglin is a transmembrane homodimeric glycoprotein that plays a key role in angiogenesis and vascular remodeling, acting as a co-receptor of TGF- $\beta$  family members in endothelial cells, and modulating the TGF- $\beta$  signaling pathway through ALK-1 / ALK5. Mutations in endoglin gene are responsible for a rare disease known as Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), associated with recurrent bleedings and arteriovenous malformations. Endothelial damage in HHT has been postulated as one of the possible "second events" necessary for the formation of arteriovenous malformations. Under endothelial damage, the transcription factor Krüppel-Like-Factor 6 (KLF6) translocates into the cell nucleus to regulate a variety of target genes involved in endothelial repair and vascular remodeling, including components of the membrane TGF- $\beta$  receptor family complex such as endoglin and ALK1. While most of endoglin studies have focused on the two membrane isoforms, the regulation and role of soluble endoglin are poorly understood. It is already known that membrane metalloproteinase 14 (MMP14) targets membrane endoglin in endothelial cells to release soluble endoglin to the medium. Soluble endoglin is involved in many cardiovascular, inflammatory and tumor pathologies, and it is known to have an antiangiogenic function. The fact that some of the treatments used for HHT have antiangiogenic properties raises the question of whether this soluble endoglin can modulate the arteriovenous malformations.

### **Objectives**

The general objective of this thesis is to study the expression of soluble endoglin during endothelial damage, as well as its function on endothelial cells and on the processes of angiogenesis and vascular remodeling. To better understand this goal, it has been divided into three more specific objectives:

- Study the *in vitro* effect of endothelial damage on the regulated expression of the membrane metalloproteinase MMP14 and endoglin, as well as the release of soluble endoglin.

- Descriptive analysis of the *in vitro* effect of soluble endoglin on proteins and endothelial genes involved in angiogenesis processes.
- Study the effect of soluble endoglin on arteriovenous malformations produced in retinas of a murine model *Knock out* for *Eng* gene.

### **Results:**

After an *in vitro* denudation of human endothelial cell monolayers, it was observed that the gene expression of the transcription factor KLF6 was increased in the central hours of wounding, followed by an increase of MMP14 and, consequently, a release of soluble endoglin. Concomitant to this process, MMP14 co-localized with endoglin on the membrane of cells with a migratory phenotype. In addition, an endothelial denudation performed in a femoral artery of a *Klf6*<sup>+/-</sup> transgenic mice showed lower levels of MMP14 in their vasculature, compared to their control littermates *Klf6*<sup>+/+</sup>. It was also found that overexpression of KLF6 produced an increase in the MMP14 gene transcription rate, and also in the transcriptional activity of different MMP14 promoter constructions. Chromatin immunoprecipitation experiments showed that KLF6 was able to interact with different regions of the MMP14 promoter, and this interaction was enhanced after endothelial damage. All these results suggested that KLF6 was acting as a master regulator during endothelial damage, repair and migration and may play an important role in pathophysiological processes, triggering an increase of soluble endoglin, among other factors.

In order to analyze the action of soluble endoglin in angiogenesis and in development of arteriovenous malformations, human endothelial cells (HUVECs) and mouse endothelial cells (MLECs), control and *Knock out* for the *Eng* gene, were used as *in vitro* models. The *in vivo* model of postnatal retinal neovascularization of *Eng*<sup>fl/fl</sup>-*VECre-ERT* mice was also used to generate an endothelial cell specific endoglin gene depletion.

Treatments with soluble endoglin were performed on endothelial cells, and proteins of the secretome were analyzed using iTRAQ technology or angiogenesis arrays. Levels of proteins with a pro-angiogenic and pro-migratory function were diminished when endothelial cells were treated with soluble endoglin, emphasizing its previously described antiangiogenic effect. On the other hand, when *Eng*-KO endothelial cells were treated with soluble endoglin, it appeared to modulate some proteins that were increased or decreased, by restoring their levels respect to a control genotype *Eng*<sup>+/+</sup>. Further results

from this thesis showed that soluble endoglin modulates the TGF- $\beta$  signaling pathway activating the ALK5-Smad 2/3-PAI-1 pathway.

After the intraocular treatment of soluble endoglin in *Eng-KO* mice retinas, the effect on arteriovenous malformations and other physical parameters of the vasculature were analyzed. This study showed that soluble endoglin injection in *Eng-KO* mice partially restored the phenotype toward an *Eng-WT* murine model, decreasing the number of arteriovenous malformations. These results reveal a new function for soluble endoglin as a possible regulator of the abnormal vasculature in HHT1.

### **Conclusions:**

- During vascular remodeling after endothelial damage, expression of endoglin and MMP14 increase and also co-localize at the cell membrane, increasing the levels of soluble endoglin released to the media as a result of increased MMP14 activity and the specific proteolytic cleavage of its target, endoglin.
- The transcription factor KLF6 is involved in the increment of MMP14 expression during endothelial damage and in the activation of *MMP14* gene promoter expression through its binding to the GC rich regions.
- The transcription factor KLF6 can be considered as a "master regulator" during the process of endothelial damage, activating genes involved in angiogenesis and vascular remodeling, such as *ENG*, *ALK1*, *IL-6* and *MMP14*.
- High concentrations of soluble endoglin inhibit endothelial cell migration and angiogenesis by decreasing the expression of some pro-angiogenic proteins that are released into the medium, such as VEGF and FGF.
- Soluble endoglin activates the pro-inflammatory pathways STAT/IL-6 and NF $\kappa$ B, and modulates other proteins from the TGF- $\beta$  signaling pathway through the ALK5 receptor, pathway related to the endothelial quiescent state and inhibition of angiogenesis.
- The proteomic analysis of secretomes from HUVECs treated with soluble endoglin, performed by iTRAQ and angiogenic arrays, indicates that soluble endoglin modulates important biological functions of angiogenic processes, acting as antiangiogenic protein.

- Soluble endoglin injected intraocularly into retinas of the inducible murine model *Eng Knock Out (Eng-iKOe)*, modulates several parameters of the abnormal retinal vasculature (number of capillary junctions, vein length, migration and vascular density), and decreases the area covered by abnormal vessels, as well as the width and number of arteriovenous malformations, thus favoring the normalization of vessels.

## RESUMEN

### Introducción

Endoglin es una glicoproteína homodimérica transmembrana que cumple un papel fundamental en la angiogénesis y remodelado vascular, actuando como co-receptor en la señalización de TGF- $\beta$  de la célula endotelial y modulando la vía de señalización a través de ALK-1/ALK5. Mutaciones en heterocigosis del gen de endoglin causan una enfermedad rara conocida como Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT), caracterizada por sangrados recurrentes y malformaciones arteriovenosas. En HHT, el daño endotelial se ha postulado como uno de los posibles “segundos eventos” necesarios para que se produzcan estas malformaciones arteriovenosas. Bajo un daño endotelial el factor de transcripción *Krüppel-like-factor 6* (KLF6) se transloca al núcleo para regular diferentes genes diana involucrados en reparación endotelial, incluyendo entre ellos componentes de la familia de TGF- $\beta$  como endoglin y ALK1. Mientras que la mayoría de los estudios sobre endoglin se han focalizado en sus isoformas de membrana, poco se conoce de la regulación y el papel que puede jugar la endoglin soluble. Se sabe que es liberada al medio como consecuencia del corte de endoglin de membrana por la metaloproteínasa MMP14 en las células endoteliales; que está aumentada en diversas patologías cardiovasculares, inflamatorias y tumorales; y que tiene, principalmente, una función antiangiogénica. El hecho de que algunos de los medicamentos usados en el tratamiento para HHT tengan propiedades antiangiogénicas, plantea la cuestión de si endoglin soluble puede tener también una acción beneficiosa en la prevención y tratamiento de las malformaciones arteriovenosas.

### Objetivos:

El objetivo general de esta tesis es profundizar en la regulación de la liberación de endoglin soluble durante el daño endotelial, así como en la función de ésta sobre las células endoteliales y los procesos de angiogénesis y remodelado vascular. En base a su mejor comprensión, se procedió a dividirlo en tres objetivos más específicos:



- Estudio del efecto *in vitro* del daño endotelial sobre la regulación de la expresión en la membrana celular de la metaloproteinasa MMP14 y de endoglina, así como en la liberación de endoglina soluble.
- Análisis descriptivo del efecto *in vitro* de endoglina soluble sobre proteínas y genes endoteliales implicados en angiogénesis.
- Estudio del efecto de endoglina soluble sobre las malformaciones arteriovenosas producidas en retinas de un modelo murino iKO para endoglina.

### **Resultados:**

Tras realizar un daño endotelial *in vitro* en una monocapa de células endoteliales humanas, se pudo observar que la transcripción génica del factor KLF6 se incrementaba en las horas centrales de cierre de herida, seguido de un aumento de MMP14 y, por consiguiente, de una mayor liberación de endoglina soluble. Concomitante a este proceso, MMP14 co-localizó con endoglina en la membrana de las células con un fenotipo más migratorio. Adicionalmente, tras una denudación endotelial *in vivo* en la arteria femoral de ratones transgénicos *Klf6*<sup>+/-</sup> se detectaron menores niveles de MMP14 en su vasculatura, comparado con sus controles *Klf6*<sup>+/+</sup>. Igualmente, la sobreexpresión de KLF6 producía tanto un aumento de la transcripción génica de MMP14 como un incremento muy marcado en la actividad transcripcional de diferentes construcciones del promotor de MMP14. Mediante inmunoprecipitación de cromatina, se demostró que KLF6 interacciona con distintas regiones del promotor de MMP14 y que esta interacción es mayor tras el daño endotelial. Todos estos resultados sugerían que KLF6 estaba actuando como un regulador clave durante el daño endotelial, reparación y migración, y que puede jugar un papel muy importante en procesos fisiopatológicos, desencadenando un aumento de endoglina soluble entre otros factores.

Con la finalidad de analizar la acción de endoglina soluble en angiogénesis y desarrollo de malformaciones arteriovenosas, se utilizaron como modelos *in vitro* células endoteliales humanas (HUVECs) y células endoteliales de ratón (MLECs), tanto controles como *Knock out* para el gen de *Eng*, y el modelo *in vivo* de neovascularización de retina postnatal de ratones *Eng*<sup>fl/fl</sup>-*VECre-ERT*, para generar una depleción génica de endoglina específica en las células endoteliales.

Sobre las células endoteliales se realizaron tratamientos con endoglina soluble y se analizó el secretoma, bien mediante la tecnología iTRAQ o bien con arrays angiogénicos. Tras este análisis, se pudieron detectar proteínas consideradas fundamentalmente pro-angiogénicas

que disminuían su expresión cuando las células endoteliales control eran tratadas con endoglina soluble, recalcando así su efecto antiangiogénico ya descrito. Por el contrario, cuando las células endoteliales *Eng-KO* eran tratadas con endoglina soluble, se producía un aumento o disminución de los niveles de algunas proteínas, de forma que se restablecían los niveles que tenían dichas proteínas en las células control *Eng<sup>+/+</sup>*. Además, resultados de esta tesis muestran que endoglina soluble modula la ruta de señalización de TGF- $\beta$  activando la vía ALK5-Smad2/3-PAI1 y disminuyendo, por tanto, la vía de ALK1-Smad1/5/8-Id1.

Con el modelo *in vivo*, se pudo analizar tras un tratamiento intraocular de endoglina soluble, el efecto de ésta sobre las malformaciones arteriovenosas en retinas de ratones *Eng-iKOe* y sobre otros parámetros físicos de la vasculatura. Este estudio permitió comprobar que endoglina soluble normalizaba parcialmente el fenotipo del modelo murino *Eng-iKOe*, disminuyendo el número de malformaciones arteriovenosas. Estos resultados revelan una nueva función de endoglina soluble como un posible regulador de la vasculatura anormal en HHT1.

### **Conclusiones:**

- Durante el remodelado vascular que se produce tras el daño endotelial, aumenta la expresión de endoglina y MMP14 y ambas proteínas co-localizan en la membrana, incrementando los niveles de endoglina soluble liberada al medio como consecuencia del aumento de la actividad de MMP14 y el corte proteolítico de su diana, endoglina.
- El factor de transcripción KLF6 está implicado tanto en el aumento de la expresión de MMP14 durante el daño endotelial como en la transactivación del promotor del gen *MMP14* mediante su unión a las regiones ricas en GC.
- El factor de transcripción KLF6 puede considerarse como un “Regulador maestro” durante el proceso de daño endotelial activando genes implicados en la angiogénesis y remodelado vascular como son *ENG*, *ALK1*, *IL-6* y *MMP14*.
- Altas concentraciones de endoglina soluble, inhiben la migración endotelial y la angiogénesis disminuyendo la expresión de determinadas proteínas pro-angiogénicas que se liberan al medio como VEGF y FGF.
- La endoglina soluble activa la ruta pro-inflamatoria STAT/IL-6 y NF $\kappa$ B, y modula otras proteínas de la ruta de señalización de TGF- $\beta$  a través del receptor ALK5, vía relacionada con el estado de quiescencia e inhibición de la angiogénesis.

- El análisis proteómico del secretoma de HUVECs y MLECs tratadas con endoglina soluble, indica que ésta modula la expresión de diversas proteínas clave en procesos angiogénicos.
- La endoglina soluble inyectada de forma intraocular en retinas del modelo murino inducible *Knock out* para el gen de *Eng* (*Eng-iKOe*), modula diversos parámetros de la vasculatura anómala de la retina (número de uniones capilares, longitud de venas, migración y densidad vascular), y disminuye tanto el área cubierta por vasos anómalos, como el ancho y número de malformaciones arteriovenosas, favoreciendo con todo ello la normalización de los vasos.

# *INTRODUCCIÓN*

*Lo que sabemos es una gota de agua,  
lo que ignoramos es el océano*

*(Isaac Newton)*



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Sistema vascular

El reconocimiento de la importancia que tiene el sistema circulatorio en la fisiología de los organismos, aunque ya descrito en parte en siglos anteriores a través de diversos estudios, no sobrevino hasta el siglo XVII (1628), tras la publicación del tratado de William Harvey, *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et sanguinis in Animalibus* (Ejercicio anatómico del corazón y sangre en los seres vivos). En este tratado se describió, por primera vez, la presencia de un sistema circulatorio cerrado en el cuerpo, incluyendo la circulación pulmonar y la del corazón (Chapman y col., 1995; Brown y col., 1994; Jin y col., 2009). Algunos años más tarde, el científico Marcello Malpighi pudo describir, gracias al avance de la microscopía, que las arterias y venas estaban conectadas por capilares (Brown y col., 1994; Jin y col., 2009). De esta manera, se comenzó a estudiar y a entender más detalladamente la función y estructura del sistema vascular en los organismos.

El desarrollo vascular es esencial, no sólo para el proceso inicial de formación y diferenciación de los órganos durante la embriogénesis, sino también para el correcto mantenimiento de sus funciones así como para reparaciones de heridas y funciones reproductivas ya en la etapa adulta (Ferrara, 2000).

## 2. Angiogénesis y vasculogénesis

La formación de un sistema vascular maduro, tanto durante el desarrollo embrionario como en la fase adulta, depende fundamentalmente de dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis (Risau, 1997; Adams y Alitalo, 2007).

La vasculogénesis es la formación *de novo* de los vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario, aunque existen diversos estudios que demuestran que también se da en el organismo adulto en otros procesos fisiopatológicos como heridas, reproducción y procesos tumorales e isquémicos, entre otros (Asahara y col., 1997; Sato y col., 2002; Shi y col., 1998; Aicher y col., 2007; Tongers y col., 2010).

La vasculogénesis se inicia tras la diferenciación de las células progenitoras del mesodermo hacia hemangioblastos y de éstas en células hematopoyéticas y células precursoras endoteliales (angioblastos) (Risau, 1997; Adair y Montani, 2010; Schmidt y col., 2007) que generan islotes en una primera fase y tras asociarse, migrar y proliferar *in situ*, forman una red primitiva vascular o plexo vascular primario que, con ayuda de factores de crecimiento y diferenciación, dan lugar a células endoteliales (Yancopoulos y col., 2000) y a un endotelio tubular continuo (Adams y Alitalo, 2007). Este plexo vascular primario se caracteriza por tener, en la zona más externa alrededor del lumen, células endoteliales ya diferenciadas y por adoptar una forma de "panal" con un diámetro de los vasos más o menos uniforme (Risau, 1997; Adams y Alitalo, 2007). Factores clave implicados en este proceso inicial de formación de la vasculatura son: FGFs, VEGF, TGF- $\beta$ , la familia de hedgehog, angiopoyetinas y neuropilinas (Carmeliet, 2000; Kawasaki y col., 1999; Rossant y Howard, 2002; Patel-Hett y D'Amore, 2011; Vokes y col., 2004; Byrd y Grabel, 2004; Argraves y col., 2002; Poole y col., 2001; Jones, 2001).

En la vasculogénesis adulta esta formación inicial de islotes no se produce y se asocia a las células progenitoras vasculares o mesenquimales circulantes (Drake, 2003). En este aspecto, cada vez más estudios demuestran que la formación de vasos en el adulto puede ocurrir, igualmente, a través del reclutamiento, proliferación y tubulización de células circulantes derivadas de médula ósea en determinados órganos o tejidos como cerebro, hígado, corazón y músculo esquelético (Tepper y col., 2005).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la extensión o remodelado de los preexistentes, gracias a la migración y proliferación de las células

endoteliales previamente diferenciadas. Este proceso se produce mediante dos mecanismos diferentes: angiogénesis ramificante o germinativa (*Sprouting*) y angiogénesis no ramificante (*intussusception*).

Los pasos básicos en la angiogénesis ramificante incluyen una degradación proteolítica de la membrana basal y matriz extracelular, la proliferación de las células endoteliales previamente diferenciadas, tubulogénesis, fusión de los vasos y su extensión, y la estabilización y maduración de los vasos por los pericitos y células musculares lisas (*Smooth muscle cells* o *SMC*) y el depósito de matriz extracelular. Este tipo de angiogénesis responde normalmente a un estímulo hipóxico que provoca la secreción de un factor proangiogénico como VEGF-A (Adair y Montani, 2010; Gerhardt, 2003, 2008). En este proceso cabe destacar la existencia de células endoteliales de punta (*Tip cells*), células polarizadas que apenas proliferan, caracterizadas por las extensiones filopodiales y que dirigen la migración (De Smet y col., 2009). A éstas les siguen las "células del tallo" (*Stalk cells*) que, a diferencia de las anteriores, sí proliferan y al no estar rodeadas por pericitos y células musculares, pueden extenderse y migrar (van Hinsbergh y Koolwijk, 2008). Las células del tallo forman el lumen vascular y se caracterizan por establecer uniones nuevas con las células cercanas y sintetizar componentes de la membrana basal (Thurston y Kitajewski, 2008; Phng y Gerhardt, 2009). En la zona menos activa del vaso y en íntimo contacto con los pericitos y células musculares lisas se encuentran las llamadas *phalanx cells* que se mantienen en un estado quiescente y que ayudan al mantenimiento de la estabilidad y permeabilidad del vaso (Zhuang y col., 2011). Las células *Tip* y *Stalk* pueden intercambiar sus fenotipos dependiendo del balance entre factores proangiogénicos como VEGF y Jagged-1 (JAG-1) y factores supresores de proliferación celular como Dll4 (*delta-like ligand 4*)-Notch entre otros (Vandekeere y col., 2015; Eilken y Adams, 2010; Wacker y Gerhardt, 2011; Herbert y col., 2011).

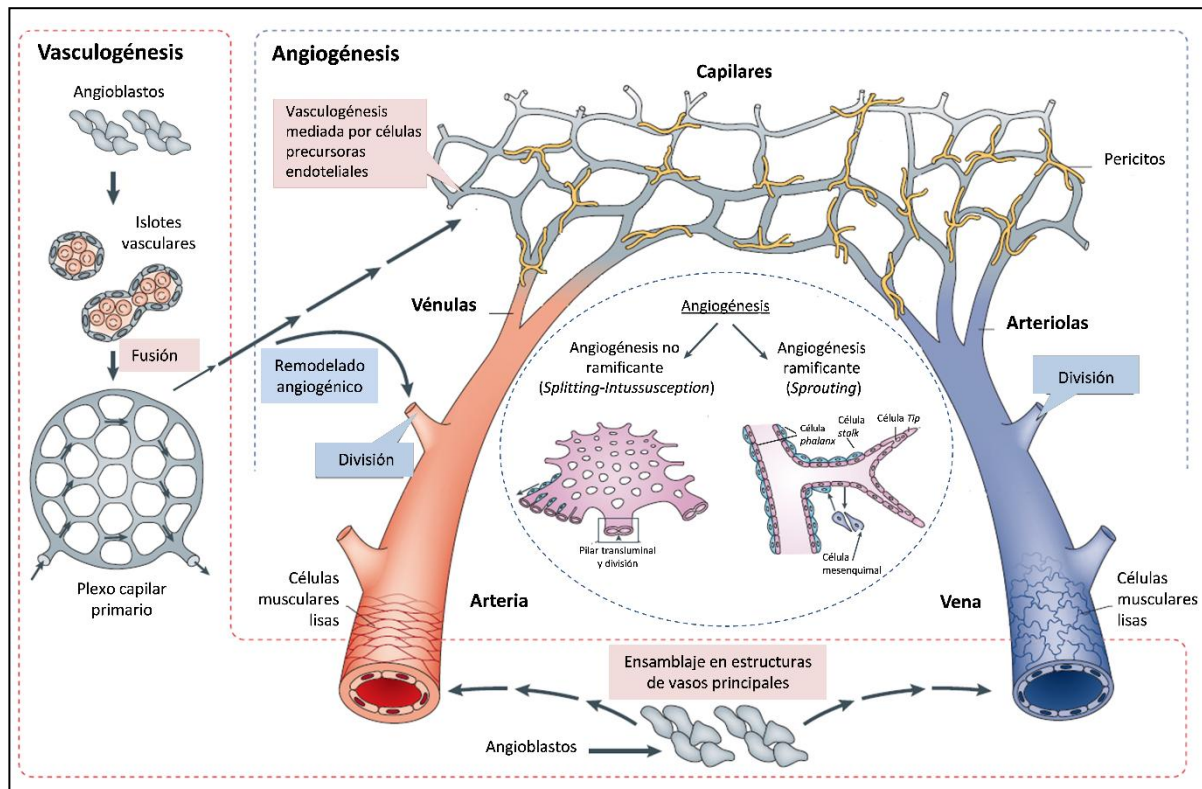
La angiogénesis no ramificante o de rotura (*Intussusceptive/Splitting angiogenesis*) suele ocurrir durante el remodelado y crecimiento vascular (Makanya y col., 2009; Burri y Tarek, 1990; Carmeliet y Jain, 2011). Se trata de un proceso mediante el cual las paredes vasculares opuestas se extienden y se invaginan hacia el lumen, causando la formación, mediante la reorganización de contactos intercelulares, de un pilar transluminal o nueva pared vascular que es invadido a su vez por miofibroblastos, pericitos y fibras de colágeno. La formación del pilar transluminal es un mecanismo esencial en el crecimiento,



arborización, bifurcación, remodelado, formación, división y acortamiento de nuevos vasos (Adair y Montani, 2010; Makanya y col., 2009; Djonov y col., 2003). Determinados factores como VEGF, angiopoyetinas, efrinas, TGF- $\beta$  y PDGF pueden estar involucrados en la activación de este proceso (Kurz y col., 2003). La angiogénesis no ramificante es un proceso más rápido y eficiente que la angiogénesis ramificante, ya que se produce el remodelado de la vasculatura según la demanda local de un órgano o tejido, y no es necesario una proliferación celular, degradación de la membrana basal, ni invasión del tejido circundante para que se formen los nuevos vasos (Adams y Alitalo, 2007).

Adicionalmente a estos procesos existe otro conocido como arteriogénesis, que consiste en el remodelado de las arterias ya existentes con la finalidad de incrementar su diámetro luminal en respuesta al aumento de flujo sanguíneo (Heil y col., 2006; Semenza, 2007).

Todos estos procesos son importantes para entender la regulación del remodelado vascular, tanto en el embrión como en el adulto. Angiogénesis y vasculogénesis deben estar estrictamente reguladas ya que el sistema circulatorio es capaz de reorganizarse ante estímulos proangiogénicos y antiangiogénicos, según las necesidades de irrigación (ante una falta o exceso de oxígeno y nutrientes) de un órgano o tejido en un determinado momento, mediante la creación o modelado de nuevos vasos a partir de los ya preexistentes *o de novo* a partir de angioblastos que se encuentran en la circulación. La desregulación, tanto por exceso o por defecto, puede resultar en patologías graves como favorecer el crecimiento y desarrollo de una masa tumoral o enfermedades isquémicas que pueden llevar a necrosar algunos órganos (Carmeliet y Baes, 2008; Carmeliet, 2005). Hoy en día, ante una enfermedad isquémica se buscan terapias proangiogénicas, y ante una enfermedad tumoral, antiangiogénicas.



**Figura 1. Esquema básico de Vasculogénesis y Angiogénesis.**

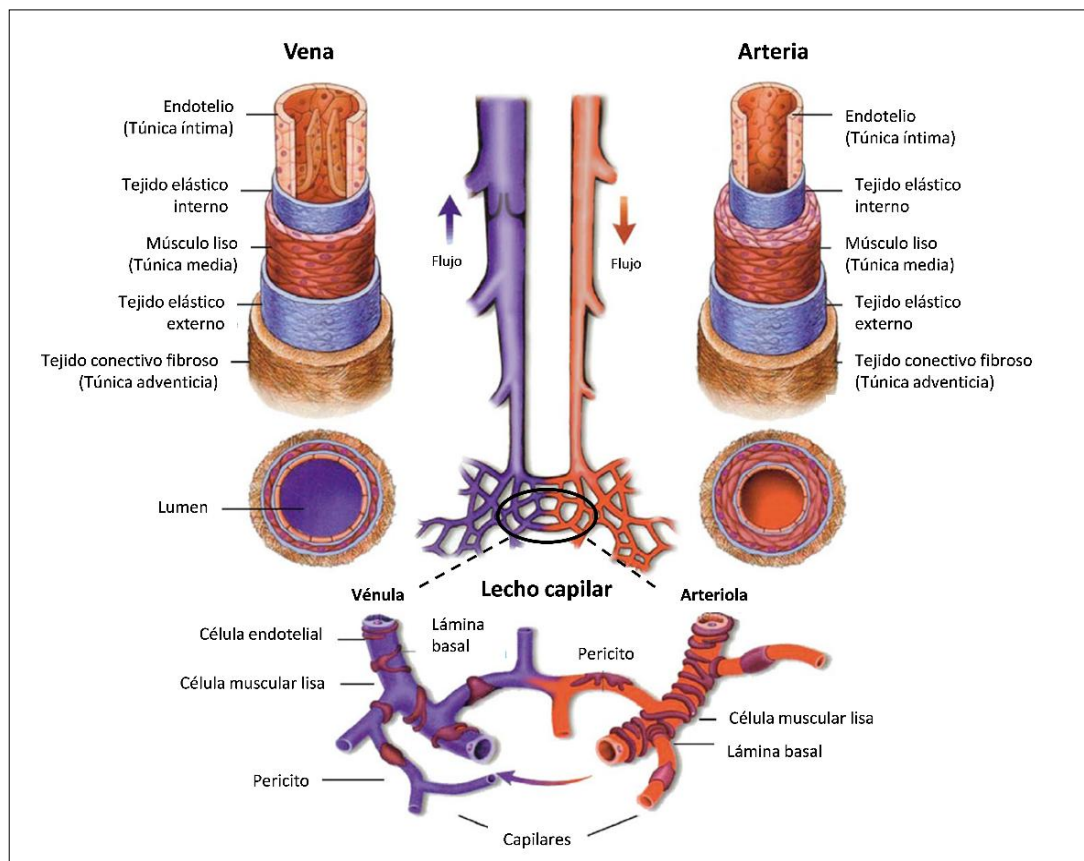
Durante la vasculogénesis las células mesodérmicas se diferencian a células precursoras endoteliales o angioblastos, que forman los agregados conocidos como islotes vasculares. Estos islotes tras fusionarse dan lugar al plexo vascular primario del saco vitelino y del embrión que durante el proceso de angiogénesis se remodelarán para formar la red vascular madura formada por capilares, vénulas, arteriolas, venas y arterias. La vena cardinal y la arteria aorta dorsal se forman directamente mediante el ensamblaje de angioblastos. En las etapas adultas también puede existir vasculogénesis mediante la incorporación de células precursoras endoteliales a la circulación que pueden contribuir, tanto a procesos de regeneración, como patológicos. Las células musculares lisas se asocian a las venas y arterias y los capilares están cubiertos por pericitos. Se considera que existen dos tipos diferentes de angiogénesis: i) angiogénesis ramificante (en la que las células endoteliales migran y proliferan en la matriz extracelular para formar nuevos vasos en respuesta a estímulos angiogénicos, siendo las células endoteliales que migran las células de la punta o *Tip cells* y las células que proliferan en respuesta a citoquinas como VEGF las células *stalk*, y el lumen del nuevo vaso se forma por la fusión de vacuolas entre células cercanas; y ii) angiogénesis no ramificante en la que se produce la separación de un vaso en dos por la formación de un pilar transluminal, siendo este proceso de formación de nuevos vasos metabólicamente más eficiente. Ambos tipos de angiogénesis necesitan de células musculares lisas y pericitos para estabilizar los nuevos vasos. Algunas células mesenquimales en respuesta a factores como PDGF, se pueden diferenciar a células musculares y asociarse al vaso en formación (Adaptado de Adams y Alitalo, 2007 y ten Dijke y Arthur, 2007).

### 3. Los vasos sanguíneos. Estructura, diferencias y función.

El sistema circulatorio sanguíneo está formado por una compleja red de arterias, venas y capilares que distribuyen la sangre a lo largo del organismo, suministrando oxígeno y nutrientes y retirando dióxido de carbono y productos de desechos de los tejidos, con la finalidad de mantener el equilibrio homeostático del cuerpo. Las arterias y venas se expanden creciendo concéntricamente y mediante remodelación vascular y angiogénesis no ramificante, mientras que los capilares suelen crecer mediante angiogénesis ramificante, generando cada vez redes más complejas y divididas. Las arterias, venas y capilares se diferencian entre sí, tanto en su función como en las capas concéntricas que lo componen. La diferencia en la composición de sus elementos vasculares proviene de las distintas propiedades funcionales de éstos. Las arterias, encargadas de transportar la sangre oxigenada, deben soportar mayores presiones sanguíneas y el flujo pulsátil producido por el corazón, por lo que está más engrosada la capa de células musculares (túnica media), compuesta por células musculares lisas, fibras de colágeno, elastina y proteoglicanos y otras proteínas de matriz extracelular. Por el contrario, las venas, al soportar menor presión sanguínea, se componen de una capa de células musculares más estrecha y poseen válvulas que previenen del reflujo sanguíneo favoreciendo el retorno de la sangre hacia el corazón. Ambos tipos de vasos se van dividiendo en estructuras de menor diámetro: arteriolas (arterias de menos de 0,1mm de diámetro y en las que generalmente la lámina elástica interna está ausente) y vénulas (venas con un máximo de 1mm de diámetro que se componen principalmente de la lámina basal con la monocapa de células endoteliales recubiertas por las llamadas células murales que son pericitos o células musculares de naturaleza mesenquimal, con morfología fibroblástica) (Cleaver y Krieg, 2010).

Las estructuras más pequeñas que irrigan los tejidos en las que se divide este sistema vascular son los capilares, formados por una monocapa de células endoteliales recubierta por la lámina basal. Se distinguen diferentes tipos según su función y el tejido u órgano que irrigan: i) continuos (recubiertos de forma continua con células endoteliales y su membrana basal y sin aperturas en las paredes); ii) fenestrados (con pequeñas aberturas, de unos 80-100nm de diámetro que permiten el paso de macromoléculas); y iii) sinusoidales (con gran lumen, numerosas aperturas y lámina basal discontinua) (Cleaver y Melton, 2003).

Arterias y venas están formadas por capas concéntricas que, desde la capa más interna a la más externa se suceden de la siguiente manera: túnica íntima, compuesta por el endotelio, la membrana basal y una capa elástica interna; túnica media, formada por capas de células musculares lisas concéntricas además de fibras de colágeno y elastina; y túnica adventicia, formada por tejido conectivo fibroso (Cleaver y Melton, 2003; Cleaver y Krieg, 2010).



**Figura 2. Diferencia estructural entre arteria y vena del sistema vascular humano.**

Esquema de los componentes murales asociados de las venas y arterias del sistema circulatorio. Se muestran las capas que conforman la pared vascular de las venas y de las arterias, incluyendo la túnica íntima endotelial, la túnica muscular media y la túnica extracelular o adventicia. Se observa que las arterias tienen una túnica media mucho más engrosada que las venas. La red capilar consiste en una capa de células endoteliales cubierta en algunas zonas por los pericitos (Adaptado de Cleaver y Krieg, 2010).

Los vasos sanguíneos no sólo contribuyen a la homeostasis, aportando las estructuras para el flujo de sangre desde y hacia el corazón y el intercambio de nutrientes y desechos en los tejidos, sino que también juegan un papel importante ajustando la velocidad y el volumen de flujo sanguíneo.

## 4. El endotelio. Características de las células endoteliales y función.

El endotelio es la monocapa formada por células endoteliales que conforma la capa concéntrica más interna de todos los vasos y cubre aproximadamente una superficie de  $350\text{m}^2$ ; de su correcto funcionamiento depende la fisiología vascular. Se le considera un tejido complejo y multifuncional con funciones adaptables a las necesidades específicas de tiempo y localización (Michiels, 2003) y con un metabolismo basal e inducible (Sumpio y col., 2002). Igualmente, es un tejido muy heterogéneo, ya que su composición, morfología y permeabilidad varía según la especie, el órgano que irriga, la demanda y tipos de vasos (Cleaver y Melton, 2003). Además, existen diferencias en los mediadores que libera, en la presentación de antígenos, en respuestas a estrés. Incluso exhibe propiedades morfológicas y funcionales específicas como ocurre con las células endoteliales del cerebro, que forman una fuerte barrera hematoencefálica donde interaccionan con los pericitos, formando un endotelio continuo y con fuertes uniones capilares; las células endoteliales del pulmón, que deben soportar presiones de oxígeno mayores; y las células endoteliales del hígado, que forman vasos altamente fenestrados y discontinuos, facilitando así el intercambio de metabolitos y eliminación de toxinas (Cleaver y Melton, 2003; Tse y Stan, 2010; Pries y Kuebler, 2006).

Las células endoteliales son esenciales durante la vasculogénesis y angiogénesis y son capaces de reaccionar ante determinados estímulos físicos y químicos de la circulación (Sumpio y col., 2002). El endotelio está involucrado en la regulación de la homeostasis, la actividad vasomotora, respuestas inmunitarias y de inflamación (junto con los leucocitos, macrófagos y plaquetas), coagulación y fibrinólisis (como consecuencia del equilibrio entre sustancias antitrombóticas/anticoagulantes y protrombóticas/procoagulantes), regulación del crecimiento, producción de componentes de la matriz extracelular, reparación y remodelado vascular y modulación del flujo sanguíneo y del tono vascular (como consecuencia del balance entre vasodilatadores y vasoconstrictores) (Sumpio y col., 2002; Poggesi y col., 2016).

Una disfunción en las células endoteliales puede provocar patologías como infartos, hipertensión, arteriosclerosis, aterosclerosis y trombosis, artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, ceguera asociada a diabetes y diabetes, Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

(HHT) y crecimiento tumoral (Goligorsky, 2000; Migliacci y col., 2007; Gresele y col., 2010; Jones y col., 2001; Prandoni y col., 2012; Martin y col., 2003; Koch, 2003). En estos procesos patológicos, la proliferación, migración e invasión de las células endoteliales es esencial y el estudio de los mecanismos reguladores involucrados en la expresión diferencial de genes endoteliales es un paso importante y necesario en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Determinados procesos activan o inhiben diferentes rutas de señalización que, a su vez, aumentan o disminuyen distintos marcadores asociados a la disfunción endotelial, cambiando su fenotipo y, por tanto, con consecuencias en la angiogénesis. Entre esos procesos desencadenantes destacan la hipoxia (que puede aumentar la producción local de VEGF y Endotelina 1, NO y aniones superóxido), hiperglicemia, inflamación (que puede activar citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y PAI-1, Inhibidor del activador de plasminógeno), heridas endoteliales (que incrementan el factor de Von Willebrand o VWF, induciendo el reclutamiento de plaquetas, y otros factores como NO), estrés de flujo laminar, flujo turbulento, cambios hormonales, diabetes, estrés oxidativo, senescencia celular y envejecimiento (que provocan la acumulación de productos de glicosilación avanzada, pudiendo inducir la expresión de VCAM-1 y disminuir señales primordiales como VEGF, HIF1 $\alpha$  y eNOS) (Lahtenvuo y Rosenzweig, 2012; Goligorsky, 2000; Sumpio y col., 2002; Löf y col., 2017; Forstermann y Sessa, 2012; Bergh y col., 2009; Wautier y Schmidt, 2004; Gimbrone y col., 2000).

## 5. Señalización de TGF- $\beta$ y su relación con el endotelio.

### 5.1. Superfamilia de TGF- $\beta$

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), forma parte de una gran superfamilia de proteínas, muy conservada a lo largo de la evolución, que incluye ligandos, receptores y factores de transcripción relacionados estructural y funcionalmente. Más de 35 citoquinas de esta familia han sido identificadas en el genoma humano, 7 en *Drosophila* y 4 en *Caenorhabditis elegans* (Bertolino y col., 2005). Entre las proteínas que componen la superfamilia de TGF- $\beta$  en el ser humano se encuentran, tres isoformas de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), al menos cinco activinas, tres Inhibinas, más de dieciséis BMPs o proteínas morfogénicas del hueso, nodales, miostatinas y hormona Anti-Mulleriana o AMH (Heldin y col., 1997; Schmierer y Hill, 2007; Massagué y col., 2005). Todos estos factores tienen efectos sobre la división, diferenciación, migración, adhesión, organización, transición epitelio-mesénquima y muerte celular (Massagué, 1998; Massagué, 2012). Son secretados por diversos tipos celulares, como ocurre con TGF- $\beta$ , o por células específicas del músculo esquelético como es el caso de miostatina, y pueden además, secretarse desde las etapas iniciales del desarrollo y durante la fase adulta como sucede con las BMPs o durante determinados momentos de la madurez como en el caso de la Hormona Anti-Mulleriana (Shi y Massagué, 2003; Govinden y Bhoola, 2003; Miyazono y col., 2010; Stenvers y Findlay, 2010).

La mayoría de las proteínas de esta superfamilia se generan en forma de dímeros inactivos latentes, como ocurre con el factor TGF- $\beta$ 1. Éste es sintetizado como una pre-pro-proteína, que se convierte en pro-TGF- $\beta$  tras un proceso proteolítico que sufre la región N-terminal. Dos monómeros de este TGF- $\beta$  dimerizan a través de puentes disulfuro y forman el dímero pro-TGF- $\beta$  que será, después, escindido mediante otra proteasa para dar lugar al llamado complejo pequeño latente maduro (SLC o *Small Latent TGF- $\beta$  complex*), en el que el péptido asociado latente (LAP o *Latent associated-peptide*) y péptido maduro están aún unidos mediante enlaces no covalentes. Después, mediante la acción de otras metaloproteasas (furinas o plasminas, entre otras) e integrinas, se secreta el TGF- $\beta$  maduro que ya puede unirse a sus receptores y activar una ruta de señalización determinada (ten Dijke y Arthur, 2007; Sheppard, 2005; Annes y col., 2003; Van Meeteren y ten Dijke, 2012; Bertolino y col., 2005; Weiss y Attisano, 2013). La actividad biológica del



TGF- $\beta$  maduro y activo, en su proceso de unión a los receptores, es a su vez regulado por inhibidores específicos secretados, que secuestran el ligando y bloquean su unión al receptor.

Esta superfamilia de citoquinas ejerce su función a través de rutas de señalización, detalladas en el siguiente apartado, mediadas por cinco receptores tipo II (TGF $\beta$ RII), siete receptores tipo I (TGF $\beta$ RI) o ALKs (*Activin Like Kinases*), dos receptores tipo III o co-receptores (betaglicano y endogлина) y los factores de transcripción Smads que regulan las dos rutas intracelulares de señalización canónica (ten Dijke y Arthur, 2007; Santibañez y col., 2011; Heldin, 2008, Itoh y col., 2000).

Además, muchas de estas citoquinas, como ocurre en los casos de TGF- $\beta$ 1 y BMP9, tienen un papel dual, ya que su acción sobre las rutas de señalización no sólo depende de su concentración, sino también de su interacción con otras proteínas presentes en el microambiente de las células sobre las que están actuando. Así, por ejemplo, bajos niveles de TGF- $\beta$ 1 promueven la proliferación celular y migración, de forma concomitante con una proliferación activa de los vasos y angiogénesis. Por el contrario, altos niveles de TGF- $\beta$ 1 promueven la citostasis y síntesis de proteínas de la matriz extracelular asociados con procesos de diferenciación y maduración de los vasos (Harradine y Akhurst, 2006; ten Dijke y Arthur, 2007). Debido a que la señalización de TGF- $\beta$ 1 generalmente tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular, la inactivación de esta ruta contribuye a la tumorigénesis (Shi y Massague, 2003). El factor de TGF- $\beta$ 1 se caracteriza por participar en la regulación de la proliferación, la apoptosis, la migración, la diferenciación celular, la transición epitelio-mesénquima (TEM) y por aumentar la expresión de proteínas de la matriz extracelular, así como integrinas. De esta forma, TGF- $\beta$ 1 no solo ejerce diferentes funciones dependiendo del tipo celular, sino que además, según el estado de la célula, puede ejercer efectos opuestos, como ocurre en determinados procesos tumorales (Reiss y Barcellos-Hoff, 1997).

La señalización mediada por cualquiera de las citoquinas de la familia TGF- $\beta$  está involucrada en procesos del desarrollo y morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y estabilidad de vasos en la etapa adulta. Su importancia en el desarrollo vascular se reconoció por la identificación de determinadas mutaciones en genes que codificaban para los receptores de TGF- $\beta$  (Gallione y col., 2004), así como mutaciones que originan cambios en la disponibilidad de las isoformas activas de TGF- $\beta$  en

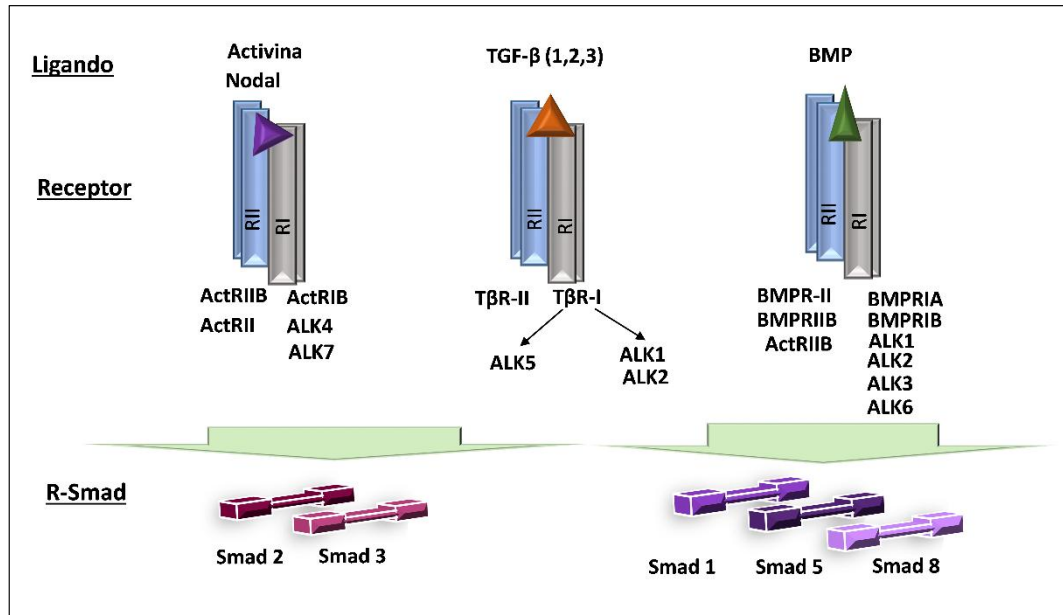


el medio extracelular (ten Dijke y Arthur, 2007) y, gracias a los modelos animales existentes, se han podido estudiar sus mecanismos de acción e interacción. Una desregulación en estos factores, tanto en sus niveles de expresión proteica como a nivel genético, está relacionado con enfermedades humanas como cáncer, fibrosis, preeclampsia, hipertensión, inflamación, enfermedades autoinmunes y vasculares (ten Dijke y Arthur, 2007; Blobel y col., 2000; Harradine y Akhurst, 2006; Biernacka y col., 2011; Lan, 2011; Valluru y col., 2011; Gordon y Blobel, 2008). Además, como estos factores están tan involucrados en procesos angiogénicos, desde hace unos años, se ha abierto un gran campo en cuanto a estudios y posibilidades para terapias del cáncer a través de la modulación de algunas de estas rutas en la vasculatura de los tumores (Harradine y Akhurst, 2006; ten Dijke y Arthur, 2007).

## **5.2 Señalización de TGF- $\beta$ dependiente de las Smads**

Cada uno de los ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  lleva a cabo sus funciones mediante la unión a receptores específicos transmembrana (Feng y Derynck, 2005). Estos receptores son del tipo serina/treonina quinasas y suelen mediar su señal mediante la formación de un complejo heteromérico formado, junto con su ligando, por dos receptores tipo I (TGF $\beta$ RI o ALKs) y dos receptores tipo II (TGF $\beta$ RII) (Feng y Derynck, 2005; ten Dijke y Arthur, 2007; Santibañez y col., 2011). Existen siete receptores tipo I diferentes (ALK1-ALK7; *Activin receptor-like kinases*) y cinco receptores tipo II que son ActRIIA (*Activin receptor type IIA*), ActRIIB (*Activin receptor type IIB*), BMPRII (*BMP type II receptor*), TGF $\beta$ RII (*TGF- $\beta$  type II receptor*) y AMHRII (*Antimüllerian hormone type II receptor*). Los ligandos pueden unirse a las diferentes combinaciones entre receptores creando la especificidad de la señalización (van Meeteren y col., 2011). TGF- $\beta$ s señalizan habitualmente vía ALK5 y TGF $\beta$ RII, las activinas vía ALK4 junto a ActRIIA y ActRIIB y las BMPs señalizan vía ALK1, 2, 3 y 6 junto a BMPRII, ActRIIA y ActRIIB. En la regulación de la función endotelial por TGF- $\beta$ , la ruta de señalización mediada por ALK1 y ALK5 se considera de vital importancia (van Meeteren y col., 2011; Goumans y col., 2002; Oh y col., 2000).

Los ligandos que comprenden la subfamilia de BMPs (BMP2 y 4) exhiben una alta afinidad por los dominios extracelulares de los receptores tipo I y baja afinidad por los receptores tipo II. Al contrario que las BMPs, TGF- $\beta$ s y activinas tienen mayor afinidad por los receptores tipo II y no interaccionan directamente con los de tipo I. El acceso de los ligandos a sus receptores puede controlarse a su vez, por dos clases de moléculas con funciones opuestas. La primera clase comprendería las proteínas solubles que secuestran los ligandos en las regiones extracelulares evitando su unión a los receptores. Entre estas proteínas están la pro-región del precursor de TGF- $\beta$  o LAP,  $\alpha$ 2-macroglobulina, follistatina, Noggin e incluso se ha postulado endoglina soluble, descrita con detalle más adelante. La otra clase de moléculas que controla este acceso de ligandos a sus receptores son proteínas ancladas a membrana que actúan como receptores accesorios o co-receptores con una actividad moduladora. Entre ellas están los TGF $\beta$ RIII betaglicano o y endoglina, que tienen un gran dominio extracelular y con un 70% de homología en sus regiones transmembrana y citoplásmica (Gougos y Letarte, 1990). Endoglina, proteína que estudiamos en esta tesis doctoral, cumple un papel crítico en la homeostasis vascular (López-Novoa y Bernabeu, 2010).



**Figura 3. Especificidad de los ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  y combinaciones heteroméricas de sus receptores.**

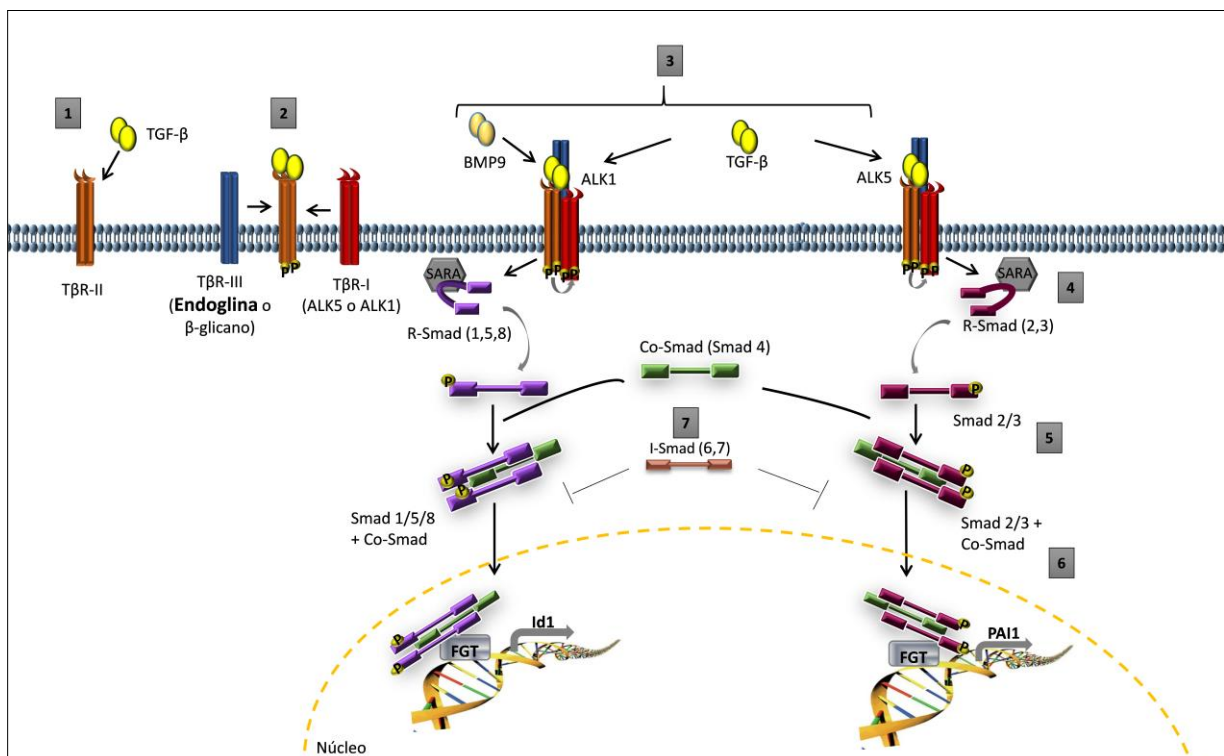
Los ligandos de TGF- $\beta$  llevan a cabo sus acciones mediante su unión al complejo de receptores formado por dos receptores tipo I y dos receptores tipo II. Se muestran, en rasgos generales, los ligandos y algunos de los receptores descritos hasta la fecha que participan en cada vía de señalización. Se muestra además la activación de los factores de transcripción tipo Smad, según el tipo de receptor que se active. Aunque en la figura no se muestra, el acceso de estos ligandos a sus receptores, se regula por la presencia de determinadas proteínas solubles en el medio

extracelular y por la modulación llevada a cabo por los co-receptores (Modificado de Bertolino y col., 2005; Shi y Massagué, 2003; y Feng y Derynck, 2005).

Tras la unión del ligando, el receptor tipo II, fosforila la región rica en serina/treonina, llamada región GS, localizada en la zona N-terminal del receptor tipo I, activándolo. En ausencia de ligando, la proteína pequeña FKBP se une a esta región GS y la ocluye impidiendo su fosforilación. Por tanto, en el estado basal, la región GS actúa como un sitio de unión y elemento autoinhibitorio de este receptor quinasa tipo I (Huse y col., 1999; Shi y Massagué, 2003). El receptor tipo I, ya activado, propaga la señal mediante la fosforilación del factor de transcripción Smad regulado por receptor (R-Smad). Tras su activación se forman complejos heteroméricos con Smad4 (Co-Smad) que se dirigen y acumulan en el núcleo donde participan en el control transcripcional de determinados genes como son SERPINE1 o PAI1 (*Plasminogen Activator Inhibitor*) o Id1 (*Inhibitor of DNA Binding-1*) (Feng y Derynck, 2005; ten Dijke y Arthur, 2007). Además, la señalización mediada por las Smads sobre sus genes diana, puede intensificarse mediante su interacción con otros coactivadores como CBP y p300 (Derynck y Zhang, 2003; Janknecht y col., 1998).

En cuanto a lo que concierne a las proteínas Smad, constan de una estructura formada por dos dominios globulares unidos por una región enlazante con múltiples sitios de fosforilación para las MAPKs, CDKs y otras PKs. La región N-terminal es conocida como MH1 y está conservada únicamente en las R-Smads, y la región C-terminal, conocida como MH2, está conservada en todos los tipos de Smad (Shi y Massagué, 2003). Sólo 5 de las 8 proteínas Smad codificadas en el genoma humano, comúnmente referidas como R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 y 8), actúan como sustrato para la familia de receptores de TGF- $\beta$ . Smad 4, también conocida como Co-Smad, es un factor común en la señalización de las R-Smads. Las proteínas Smad 6 y 7 son las conocidas como Smads-inhibitorias o I-Smad, las cuales interfirieron en las interacciones Receptor-Smad o Smad-Smad mediante el reclutamiento de ubiquitina-ligasas o fosfatasa que marcan los receptores para su degradación proteosomal e inhiben también la señalización (Massagué y col., 2005; Valdimarsdottir y col., 2006; Schmieder y Hill, 2007). Las R-Smad se encuentran, normalmente, en el citoplasma en estado basal, ancladas a microtúbulos mediante la interacción con  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina (Dong y col., 2000) y se localizan en la cercanía de la membrana gracias a la interacción con proteínas de anclaje como Dab2, TRAP1 o SARA (Derynck y Zhang, 2003; Hata y Chen, 2016). La importación y exportación nuclear de las Smads se realiza o

mediante la interacción con importinas a través de la región MH1 o directamente mediante la interacción MH2 con las nucleoporinas (Xu y col., 2002; Xiao y col., 2000). Una vez en el núcleo, las Smads reconocen secuencias específicas en el DNA, denominadas SBE (*Smad-binding elements*) cuya secuencia son 8 pb (5'-GTCTAGAC-3') o incluso secuencias ricas en GC. La actividad transcripcional dependerá de la interacción previa de las Smads con sus co-factores y co-activadores/represores así como con factores de transcripción (Morikawa y col., 2013; Zawel y col., 1998; Mullen y col., 2011).

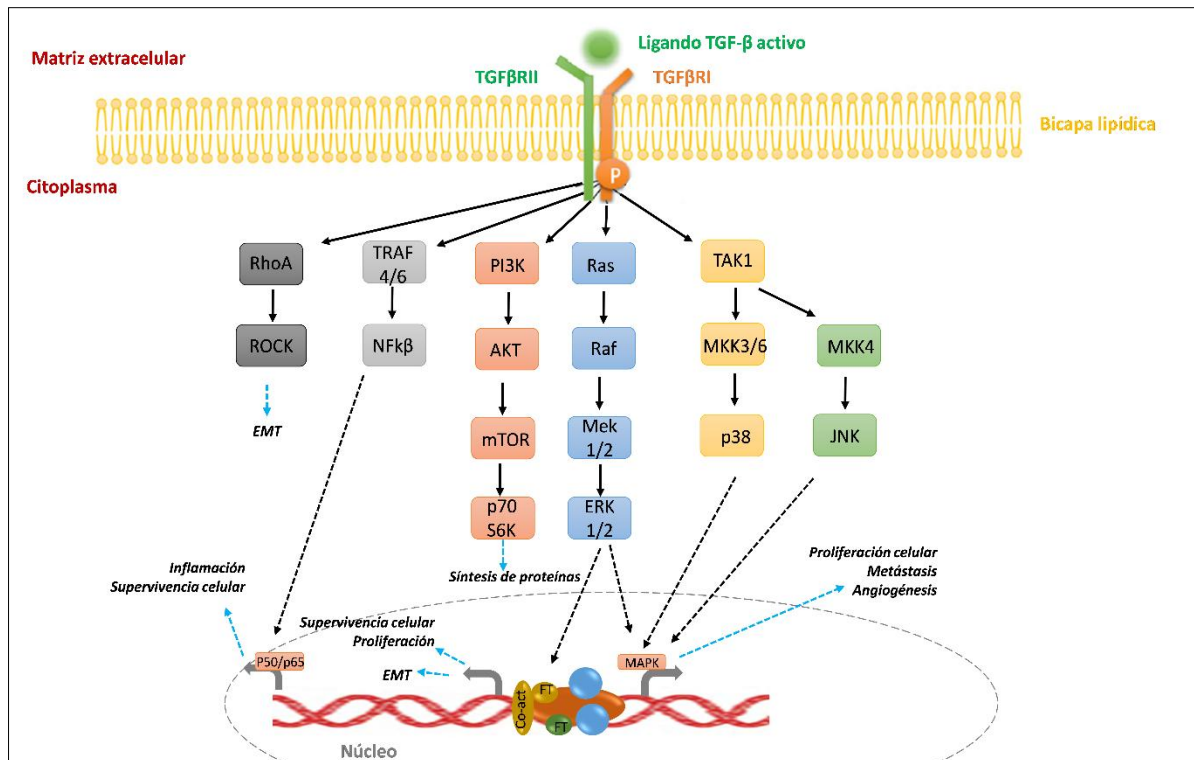


**Figura 4. Esquema general de señalización de TGF-β desde la membrana hasta el núcleo celular.**

El TGF-β circulante se une al dímero de receptor tipo II (TβRII) en la membrana celular (1). Este TβRII se autofosforila en residuos Ser-Thr (2) y recluta al dímero de receptor tipo I (TβRI, ALK5 o ALK1) y al co-receptor endoglin o betaglicano (TβRIII). La unión del ligando estabiliza la formación del complejo y el TβRII fosforila los residuos Ser-Thr del dominio GS del TβRI activando el complejo (3). Las R-Smads o Smads dependientes de receptor que se encuentran en la cercanía de la membrana celular gracias a proteínas de anclaje como SARA (4) se fosforilan en su dominio C-terminal, lo que produce un cambio conformacional permitiendo así la unión de Co-Smad o Smad cooperadora, también conocida como Smad 4 en mamíferos (5). Smad 4 puede asociarse en el citoplasma y entrar al núcleo como complejo con las R-Smads o puede asociarse dentro del núcleo tras la traslocación de las R-Smads activadas (6). Una vez que el complejo se encuentra en el núcleo, interacciona con sitios específicos del DNA, con los factores generales de transcripción (FGT) y con una gran variedad de coactivadores y co-represores específicos que modulan la expresión génica en respuesta al entorno celular. Así por ejemplo, en la célula endotelial, se pueden activar genes como ID-1, implicado en proliferación y migración y genes como PAI-1 que al contrario que el anterior, está implicado en citostasis y estabilización de los vasos. Todo este proceso de entrada al núcleo y formación de los complejos R-Smad/Co-Smad está regulado negativamente por las Smads inhibitorias o I-Smads (7). Las R-Smads, una vez que activan o inhiben los genes específicos se desfosforilan y pueden bien ser recicladas o bien degradadas por el proteosoma tras su marcaje con ubiquitina por la familia Smurf de ubiquitina-ligasas (este último proceso no está mostrado en la imagen).

### **5.3 Señalización de TGF- $\beta$ mediante la ruta no canónica**

No todas las señales que TGF- $\beta$  ejerce en la célula están mediadas por las Smads, sino que además existen respuestas independientes de ellas, "no Smads" o "no canónicas" de activación por TGF- $\beta$ . Generalmente, la activación de estas rutas ocurre o a la vez, siguiendo la misma cinética, que las Smads, o de forma indirecta por los genes previamente activados o inhibidos por la ruta canónica, y por tanto con una cinética de activación más retrasada (Derynck y Zhang, 2003). Entre estas rutas de señalización se incluyen: la ruta de Ras/MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) implicada en crecimiento celular y malignización de tumores (Downward, 2003; McCubrey y col., 2007; Lee y col., 2007); rutas mediadas por GTPasas similares a Rho (RhoA/ROCK) que promueven entre otras respuestas, cambios en el citoesqueleto, tráfico de vesículas y entrada al ciclo celular (Bustelo y col., 2007); la señalización mediada por TAK1 (*TGF- $\beta$  Activated Kinase 1*) que a su vez activa a JNK (*c-Jun-N-terminal Kinases*) implicada en apoptosis, proliferación y supervivencia celular (Bode y Dong, 2007; Bubici y Papa, 2014) y a p38 MAPK relacionada con estrés celular, inflamación, autofagia y diferenciación de osteoblastos, entre otros procesos (Chen y col., 2012; Nohe y col., 2004; Yu y col., 2002); la ruta de p13-K/Akt implicada, entre otros, en angiogénesis, tumorigénesis, proliferación, transición epitelio-mesénquima y remodelado vascular (Xia y Xu, 2015; Ren y col., 2014; Valcourt y col., 2016; Gallo y col., 2015); e incluso vías de señalización que implican miRNAs, los cuales a su vez regulan las rutas de señalización mediadas por TGF- $\beta$ , como ocurre en procesos de diferenciación ósea (Li y col., 2008) o en fibrosis (Yang y col., 2016). Todas estas vías de señalización, por tanto, pueden regular la transcripción génica de un modo independiente de las Smads o bien actuando sinérgicamente con ellas.



**Figura 5. Esquema básico de señalización de TGF-β mediante las rutas no canónicas.**

El receptor de TGF-β transmite su señal a través de otras proteínas como MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), PI3Ks (*phosphatidylinositol 3-kinase*), TRAF4/6 (*TNF receptor-associated factor 4/6*) y la familia de GTPasas Rho, entre otras. Las MAPKs activadas pueden ejercer su regulación transcripcional a través de la interacción directa con los complejos de proteínas Smad o a través de otras proteínas en la ruta de señalización por debajo de ellas. Las proteínas JNK/p38/ERK activadas pueden regular, sinérgicamente con las Smads, apoptosis y proliferación celular, además de mediar procesos de metástasis, angiogénesis y crecimiento celular a través de factores de transcripción (FT) como c-Jun y ATF y diversos co-activadores y co-represores. RhoA/ROCK puede activarse por TGF-β induciendo la formación de fibras de actina durante la transición epitelio-mesénquima (EMT) a través de mecanismos que no requieren transcripción. TGF-β también puede activar PI3K y AKT mediante la inducción de la interacción física entre la subunidad de PI3K, p85 y el complejo de receptores de TGF-β modulando rutas de síntesis de proteínas o traducción a través de la activación de mTOR/S6 quinasa. La activación por TGF-β de las proteínas TRAF, pueden iniciar una cascada de señalización a través del factor NFκB, incrementando procesos de inflamación. Las flechas negras indican la dirección que sigue la activación de las diferentes rutas de señalización y las flechas azules muestran diferentes ejemplos de procesos que pueden verse involucrados. (Modificado de Pardali y col., 2010; Costanza y col., 2017).

## 6. Endogлина. Co-receptor de la ruta de señalización de TGF $\beta$ .

A mediados de los años 80 fue identificada por primera vez la endogлина, a causa de la reacción de uno de los anticuerpos monoclonales de ratón obtenidos contra las células linfoblásticas humanas (Quackenbush y col., 1985; 1986), el anticuerpo 44G4, que identificó una proteína de la membrana endotelial hasta entonces desconocida (Gougos y Letarte, 1988 a; 1988b). Dos años más tarde el cDNA de endogлина fue aislado y se detectó que el antígeno reconocido por dicho anticuerpo, correspondía a una glicoproteína integral de membrana tipo I de 180 KDa (Gougos y Letarte, 1990). En 1993, durante el V Taller Internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, se le asignó el grupo de diferenciación CD105 (Letarte y col., 1995).

Endogлина (CD105) es una glicoproteína transmembrana homodimérica que, como se vió desde su descubrimiento, desempeña una función primordial en la fisiología endotelial y vascular, entre los que destacan procesos de angiogénesis y remodelado vascular (López-Novoa y Bernabeu, 2010; Kapur y col., 2013; Bernabeu y col., 2007). Se trata de un co-receptor o receptor auxiliar tipo III de la superfamilia de TGF- $\beta$ .

### 6.1 Expresión y distribución celular

Endogлина está presente en altos niveles tanto en el endotelio vascular del adulto, en arterias, venas y capilares (Mahmoud y col., 2009), como de forma muy temprana (a partir de la cuarta semana de gestación) durante el desarrollo del sistema vascular embrionario y endocardio (Qu y col., 1998; Gougos y col., 1992; Arthur y col., 2000).

Debido a que endogлина cumple un papel importante en la angiogénesis y remodelado vascular, no sólo su expresión está aumentada en las células endoteliales más activas, donde se considera un marcador específico, sino en otras células que también participan en el mantenimiento de la estructura y función de los vasos sanguíneos como los fibroblastos del estroma perivascular (Matsubara y col., 2000) y las células musculares lisas que rodean los vasos (Gougos y col., 1992; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). La presencia de endogлина en la mayoría de los tipos celulares de las tres capas que conforman los vasos (Túnica íntima, túnica media y túnica adventicia), permite dilucidar el importante papel que cumple esta proteína en la fisiología vascular.



Igualmente, endoglina se expresa en células estromales de la médula (Gougos y col., 1992; Robledo y col., 1996; St-Jacques y col., 1994a), células musculares lisas (Adam y col., 1998), sincitiotrofoblastos de placenta (Gougos y col., 1992; St-Jacques y col., 1994b), células precursoras de células B (Zhang y col., 1996; Gougos y Letarte, 1988b), células progenitoras mesenquimales y hematopoyéticas (Nasrallah y col., 2015), pro-eritroblastos (Bühning y col., 1991), células del linaje mieloide y monocitos activados (Lastres y col., 1992; O'Connell y col., 1992), células mesangiales del riñón (Rodríguez-Barbero y col., 2001; Quackenbush y col., 1986), células esteladas de hígado (Meurer y col., 2005), condrocitos humanos de cartílago (Parker y col., 2003), queratinocitos epidérmicos de folículos pilosos y glándulas sudoríparas (Quintanilla y col., 2003) y en fibroblastos de tejido cardíaco (Bernabeu y col., 2007).

En determinados procesos fisiológicos y patológicos, la expresión de endoglina se ve aumentada, como por ejemplo, durante el proceso de transición de monocito a macrófago (Lastres y col., 1992), durante la reparación vascular mediada por monocitos (van Laake y col., 2006), tras un proceso de isquemia-reperfusión en células endoteliales de riñón y corazón (Docherty y col., 2016), durante el desarrollo de preeclampsia en los sincitiotrofoblastos de la placenta (St-Jacques y col., 1994b), en procesos de aterosclerosis y reparación de heridas en células musculares lisas (Conley y col., 2000; Botella y col., 2002), durante la diferenciación miogénica en el desarrollo embrionario (Mancini y col., 2007), durante la eritropoyesis en células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea y eritrocitos (Chen y col., 2002; Perlingeiro, 2007) y en diferentes procesos tumorales y metastásicos, como ocurre con el melanoma (Altomonte y col., 1996; Quintanilla y col., 2003), cáncer de ovario (Henriksen y col., 1995) y cáncer de próstata (Liu y col., 2002, Craft y col., 2007).

## **6.2 Estructura y características bioquímicas**

Endoglina es una glicoproteína transmembrana homodimérica de 180 kDa, codificada en humanos en el cromosoma 9, compuesta por dos monómeros unidos por puentes disulfuro. Su estructura primaria consta de 658 aminoácidos y en ella se pueden diferenciar un péptido señal, una gran región extracelular, el dominio transmembrana hidrofóbico y el dominio citoplasmático, estos dos últimos de menor tamaño (Gougos y



Letarte, 1990; Bellón y col., 1993; Llorca y col., 2007; Gregory y col., 2014; Lastres y col., 1994; ten Dijke y col., 2008).

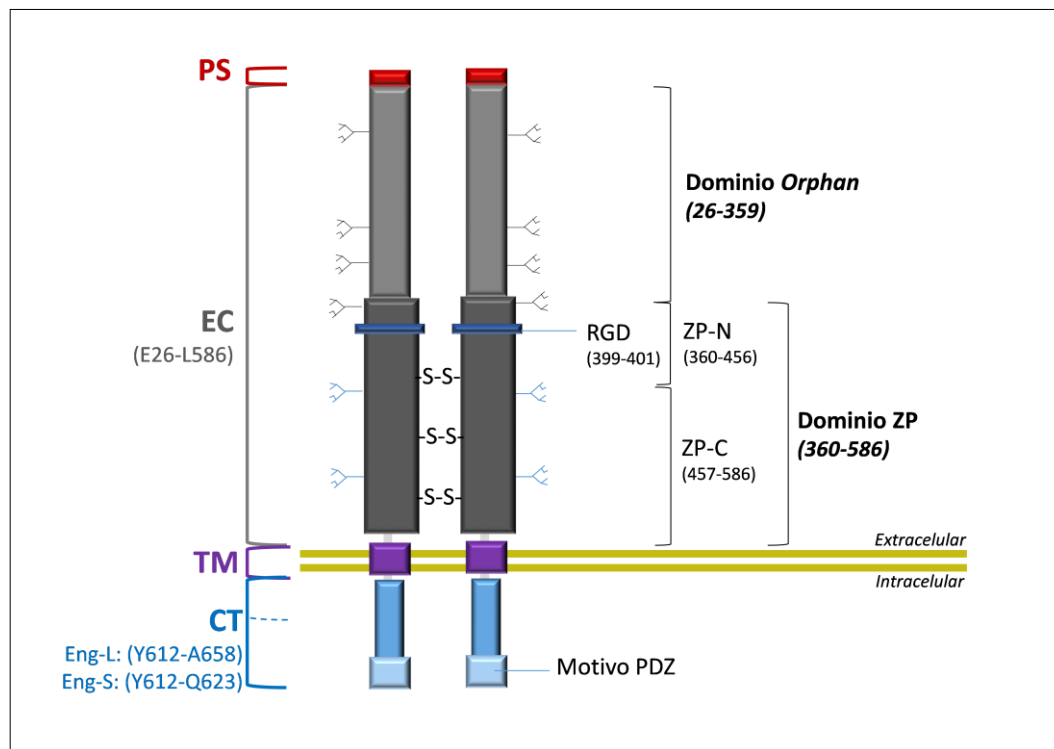
Los primeros 25 aminoácidos de su secuencia corresponden al péptido señal que dirige la proteína desde el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, hacia la membrana celular, donde endoglin ejerce su función. Este péptido señal, una vez en la membrana es degradado para dar paso a la proteína madura y funcional.

El dominio extracelular está formado por 561 aminoácidos con varios sitios de N-glicosilación. Dentro de esta región se distinguen el dominio huérfano (*Orphan domain*), que comprende los aminoácidos 26-359 y el dominio ZP que comprende del los aminoácidos 360-586. Esta región extracelular contiene residuos de cisteína responsables de la dimerización del receptor (Bellón y col., 1993). El dominio huérfano, definido así por no compartir ninguna homología con otras proteínas (Llorca y col., 2007), está codificado en los exones 2-8 y se ha descrito como dominio de unión a ligando, ya que se ha descubierto que puede unirse formando un complejo con uno de los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ , BMP9 (Castonguay y col., 2011; Alt y col., 2012). El dominio zona pelúcida (ZP) se denomina de esta manera por pertenecer a la familia de proteínas que constituyen la zona pelúcida que envuelve el óvulo de mamíferos. Consta de 260 aminoácidos y 8 residuos de cisteínas conservadas, potencialmente involucradas en la oligomerización del receptor (Jovine y col., 2005; Llorca y col., 2007). El dominio ZP se divide a su vez en dos regiones, según se encuentren en la región N o C-terminal: i) ZP-N que comprende los aminoácidos 360-457 y está codificada por los exones 9-11; y ii) ZP-C que comprende los aminoácidos 458-586 y está codificada por los exones 12-14. Dentro de este dominio ZP, se distingue la presencia del tripéptido RGD (Arg399-Gly400-Asp401) que, aunque relativamente desconocido, parece estar involucrado en la adhesión celular (Gougos y Letarte, 1990; Gougos y col., 1992; Lastres y col., 1992) y en las interacciones con integrinas (Rossi y col., 2013; 2016; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). Además esta región ZP está implicada no sólo en la unión de los monómeros de endoglin (interacción proteína-proteína), sino también en su interacción con los receptores de TGF- $\beta$ , TGF $\beta$ RII y ALK5 (Guerrero-Esteo y col., 2002; Blanco y col., 2005).

En cuanto al dominio transmembrana, poco hay descrito. Lo componen 25 aminoácidos, ricos en residuos hidrofóbicos.

El dominio intracelular o dominio citoplasmático está constituido por 47 aminoácidos (612-658) y está codificado por el exón 15. Se trata de un dominio rico en residuos serina/treonina susceptibles de ser fosforilados (Lastres y col., 1994; Pan y col., 2014). En esta región citoplasmática se encuentra el motivo PDZ que cumple un importante papel en la regulación de su fosforilación por los receptores tipo I y II, así como en la unión a otras proteínas (Guerrero-Esteo y col., 2002; Koleva y col., 2006). Además de los receptores de TGF- $\beta$ , otras proteínas con actividad quinasa pueden fosforilar endoglina en este dominio intracelular, como ocurre con el residuo Ser<sup>621</sup>, que es fosforilable por la proteína quinasa C (PKC), y los residuos Tyr<sup>612</sup> y Tyr<sup>614</sup>, fosforilables por la quinasa Src (nombre derivado de “sarcoma”). En el dominio intracelular de endoglina, además, se encuentran regiones clave implicadas en la unión y andamiaje de proteínas intracelulares, como zyxina, ZRP-1 (*Zyxin Related Protein 1*) y  $\beta$ -arrestina. Estas interacciones modulan procesos celulares como la división y migración celular involucrados en angiogénesis, (Conley y col., 2004; Sanz-Rodriguez y col., 2004; Lee y Blobel, 2007; Lee y col., 2012).

Entre otras muchas, se conocen las secuencias génicas que codifican para endoglina humana (Gougos y Letarte, 1990), murina (St-Jacques y col., 1994; Ge y Butcher, 1994) y porcina (Yamashita y col., 1994). La endoglina de ratón presenta una homología con endoglina humana del 72% pero, a diferencia de ésta, no presenta el tripéptido RGD, sino el péptido homólogo TDD (treonina-ácido aspártico-ácido aspártico) (St-Jacques y col., 1994b).



**Figura 6. Esquema de la estructura del dímero de endoglina.**

Se distinguen las regiones del péptido señal (PS), extracelular (EC), transmembrana (TM) e intracelular o citoplasmática (CT). La región CT varía en tamaño según se trate de endoglina larga (EngL) que suele ser la forma predominante y contiene el motivo PDZ, o endoglina corta (EngS) que no contiene este motivo de fosforilación y unión a otros receptores. La región extracelular se divide a su vez en el dominio huérfano (*Orphan domain*) y el dominio estructural conservado o ZP, implicado probablemente en interacciones proteína-proteína y que contiene 8 residuos de cisteína conservados, puentes disulfuro (S-S) y el triptéptido RGD. En esta región ZP se puede distinguir la secuencia N-terminal (N-ZP) y la C-terminal (C-ZP).

### **6.3. Función y señalización endotelial de endoglina**

El aumento de expresión de endoglina en las células endoteliales está asociada a procesos de angiogénesis activa (Fonsatti y col., 2003), embriogénesis (Perlingeiro y col., 2007), zonas con daño endotelial (Botella y col., 2002; Ma y col., 2000), lesiones epidérmicas (van de Kerkhof., 1998), enfermedades autoinmunes (Marazuela y col., 1995) y procesos tumorales (Duff y col., 2003; Bauman y col., 2016).

### **6.3.1 Modulación por endoglina de las fases de activación-resolución del endotelio.**

Endoglina participa, como co-receptor, regulando las dos rutas principales de señalización de TGF- $\beta$  (a través de los receptores ALK1 o ALK5) que median los estados de activación-resolución del endotelio durante la angiogénesis (Cheifetz y col., 1992; Barbara y col., 1999; Bernabeu y col., 2007; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010).

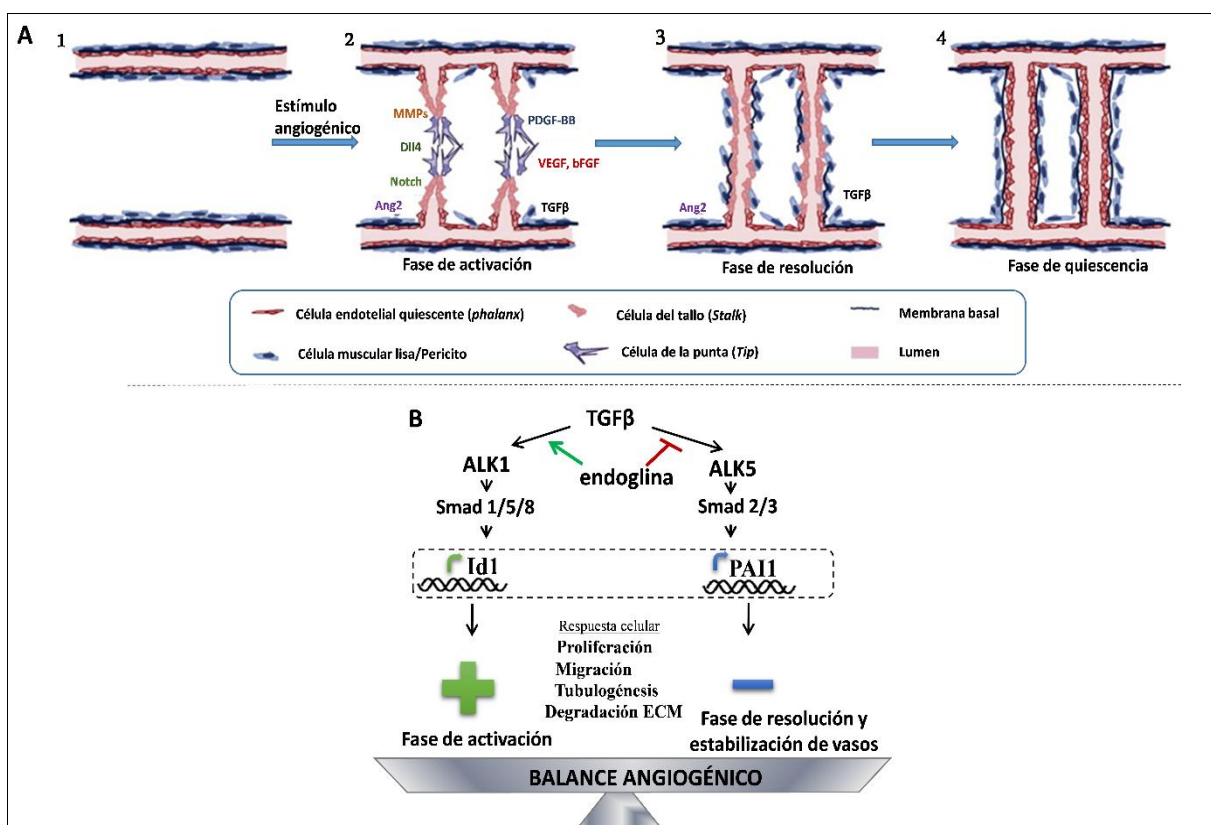
El factor TGF- $\beta$  tiene una función dual, ya que puede ejercer efectos opuestos en la célula endotelial según interaccione con el receptor tipo I, ALK1 o ALK5. La activación de la vía a través de ALK5 inhibe la proliferación celular y la migración, mientras que la activación de la vía a través del receptor ALK1 induce la proliferación y migración endotelial. La expresión del co-receptor endoglina aumenta durante la angiogénesis y es esencial para mediar la señalización a través de ALK1. En ausencia de endoglina, la vía de ALK5 es predominante y mantiene por tanto el estado quiescente del endotelio. Por el contrario, altos niveles de expresión de endoglina estimulan la vía de ALK1, e indirectamente inhiben la de ALK5, promoviendo el estado de activación de la angiogénesis (Lebrin y col., 2004).

La activación de la ruta a través de ALK1, desencadena la fosforilación de los factores de transcripción Smad 1/5/8, previamente descritos, y la consecuente activación de genes diana implicados en proliferación y migración como *ID1*, *ID2*, *Smad6* y *Smad7* (Goumans y col., 2002; ten Dijke y col., 2002; Lux y col., 2006; Ota y col., 2002). Uno de los principales genes regulados por esta ruta de señalización es *ID1*, que inhibe la diferenciación celular y activa la acción de las metaloproteasas que degradan la matriz extracelular, favoreciendo la ramificación y crecimiento de los vasos (Goumans y col., 2002; ten Dijke y col., 2003). Por tanto, se puede resumir que la modulación de la ruta por endoglina a través de ALK1 estaría implicada en el aumento de permeabilidad vascular, degradación de la membrana basal, proliferación y migración de las células endoteliales. Es de destacar que en determinadas condiciones fisiológicas, el aumento de los Smad inhibitorios (Smad 6 y 7) provocaría una retroalimentación negativa sobre esta ruta de señalización, inhibiéndola (Valdimarsdottir y col., 2006).

La activación por TGF- $\beta$  de la ruta a través del receptor ALK5 induce la fosforilación de Smad2/3 y activa genes diana como fibronectina (FN1) y el inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) entre otros, inhibiendo, en principio, la proliferación y migración de células endoteliales (Boehm y col., 1999) y promoviendo la estabilización de los nuevos vasos, ya que favorece la formación de la membrana basal y el reclutamiento de pericitos y

células musculares (Blanco y col., 2005; Goumans y col., 2003; Goumans y col., 2002). De esta manera, en el endotelio se favorece el estado de resolución y quiescencia.

La activación de una u otra ruta durante las distintas fases de la angiogénesis depende sobre todo de la dosis y duración de la estimulación por TGF- $\beta$  (Pepper y col., 1993). Así, a dosis bajas y tiempos cortos se produciría una activación de la ruta de señalización a través de ALK1. Por el contrario, a dosis altas y con una mayor duración del estímulo, se promovería la ruta de señalización a través de ALK5 (Lebrin y col., 2004). Por tanto, el balance de señalización entre estas dos vías opuestas regula la biología de la célula endotelial, que incluyen las fases de maduración y activación de la angiogénesis (ten Dijke y Arthur, 2007).



**Figura 7. Regulación general de la angiogénesis.**

**A:** La angiogénesis comprende dos fases principales, fase inicial de activación y fase final de resolución. Tras la activación de las células endoteliales por un estímulo angiogénico (hipoxia, herida...) que provoca un aumento en factores como VEGF, bFGF y TGF- $\beta$ , entre otros, comienza a degradarse la membrana basal y la célula de la punta activada (*Tip*), que sin proliferar lidera el proceso de migración, empieza a invadir la matriz y a extenderse con sus filopodios. Los nuevos vasos se van elongando mediante la proliferación de las células del tallo (*Stalk*) que van formando el lumen. Finalmente, las células endoteliales entran en la fase de resolución donde se reconstituye la membrana basal y se reclutan las células musculares y los pericitos que estabilizan al vaso, adquiriendo su fenotipo quiescente, típico de las células *phalanx* y del proceso de maduración de los vasos (Adaptado de Pardali y col., 2010). **B:** Esquema general del balance angiogénico en la célula endotelial mediado por TGF $\beta$ -Endoglina. El factor TGF- $\beta$  regula el estado de activación/resolución del endotelio mediante la activación de las rutas de señalización

mediadas por los receptores ALK1 o ALK5 y moduladas por el receptor T $\beta$ RIII, Endoglin. La unión de TGF- $\beta$  al receptor ALK1, produce la fosforilación de Smad1/5 que induce la expresión génica de Id1 y estimula la proliferación, migración y otros procesos como la degradación de la matriz extracelular, involucrados en la fase de activación de la angiogénesis. Por el contrario, una activación de ALK5, provoca la fosforilación de Smad2/3, que induce la expresión génica de *PAI-1*, entre otros genes, inhibiendo por tanto la migración, proliferación celular y tubulogénesis, y favoreciendo la fase de resolución-quiescencia endotelial. La presencia de endoglin favorecería la inducción de la ruta de ALK1 y actuaría como un regulador negativo de la ruta de señalización mediada por ALK5. La relación entre ambas señales en un determinado contexto celular, y según las necesidades del entorno, favorecerá el efecto pro-angiogénico o anti-angiogénico de TGF- $\beta$  (Modificado de Lebrin y col., 2004; Goumans y col., 2003).

### **6.3.2 Otros factores que promueven la señalización a través de su interacción con endoglin**

Endoglin se une eficientemente a los factores TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, así como a activina, BMP2 y BMP7 en presencia de los receptores tipo I y II y modula las respuestas celulares dependientes de TGF- $\beta$  interaccionando con estos receptores (Cheifetz y col., 1992; Letamendía y col., 1998; Barbara y col., 1999; Guerrero-Esteo y col., 2002). Incluso se ha descrito la unión de endoglin a los receptores tipo I y II en ausencia de ligando (Lux y col., 1999; Guerrero-Esteo y col., 2002).

Últimamente se ha descubierto que otros factores de la superfamilia de TGF- $\beta$ , como BMP9 y BMP10, pueden interaccionar directamente con endoglin (Castonguay y col., 2011; Alt y col., 2012; Gregory y col., 2014). Aunque numerosos estudios están intentando dilucidar los efectos que median BMP9/BMP10/ALK1 en células endoteliales, no hay un consenso determinado, ya que se han propuesto papeles pro y antiangiogénicos (David y col., 2007; Suzuki y col., 2010; Park y col., 2012; van Meeteren y col., 2012; Nolan-Stevaux y col., 2012). Una de estas hipótesis indica que BMP9 y BMP10, presentes en sangre con niveles entre 0,5-15 ng/mL, pueden actuar vía ALK1 como supresores de migración celular y proliferación, manteniendo el estado quiescente del endotelio (David y col., 2009; Atri y col., 2013).

### **6.3.3 Otras funciones asociadas a endoglin**

Otras funciones, detalladas a continuación, se han asociado a endoglin durante el proceso de angiogénesis.

Endoglin se puede relacionar con la especificación arterial y venosa, ya que en ratones transgénicos nulos para el gen de endoglin se ha encontrado una pérdida de identidad para los marcadores de arterias y venas tras la formación de MAV (Mahmoud y col., 2010).

En condiciones hipóxicas, proceso típico que se da en tumores sólidos, se ve aumentada la expresión de endoglina ya que su promotor contiene secuencias HRE que se pueden unir a HIF1 (Sánchez-Elsner y col., 2002; López-Novoa y Bernabeu, 2010).

Endoglina puede actuar modulando la liberación de determinados factores angiogénicos como son VEGF (Jerkic y col., 2006; Park y col., 2013) y óxido nítrico derivado de eNOS (Santibañez y col., 2007; Zucco y col., 2014), dependiendo esta modulación del tipo celular.

Endoglina puede afectar a la morfología celular, ya que en nuestro laboratorio se describió cómo en las células endoteliales precursoras BOECs (*Blood outgrowth endothelial cells*) de pacientes HHT1 (enfermedad detallada más abajo), el citoesqueleto de actina se encontraba desorganizado y la capacidad migratoria era menor (Fernández y col., 2005; 2007). Además, se ha descrito que endoglina en las células endoteliales promueve cambios de localización de ZRP-1 y zyxina, proteínas unidas a fibras de actina, lo que supone cambios en la disposición del citoesqueleto (Sanz-Rodriguez y col., 2004; Conley y col., 2004).

Igualmente, endoglina, puede modular la integridad de la barrera endotelial, ya que por ejemplo se ha observado un aumento de permeabilidad de monocapas de células endoteliales *Eng*<sup>-/-</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>, comparándolas con células control (Jerkic y Letarte, 2015) y una interacción entre endoglina e integrinas de las células murales (Rossi y col., 2016) que ayuda a la maduración vascular.

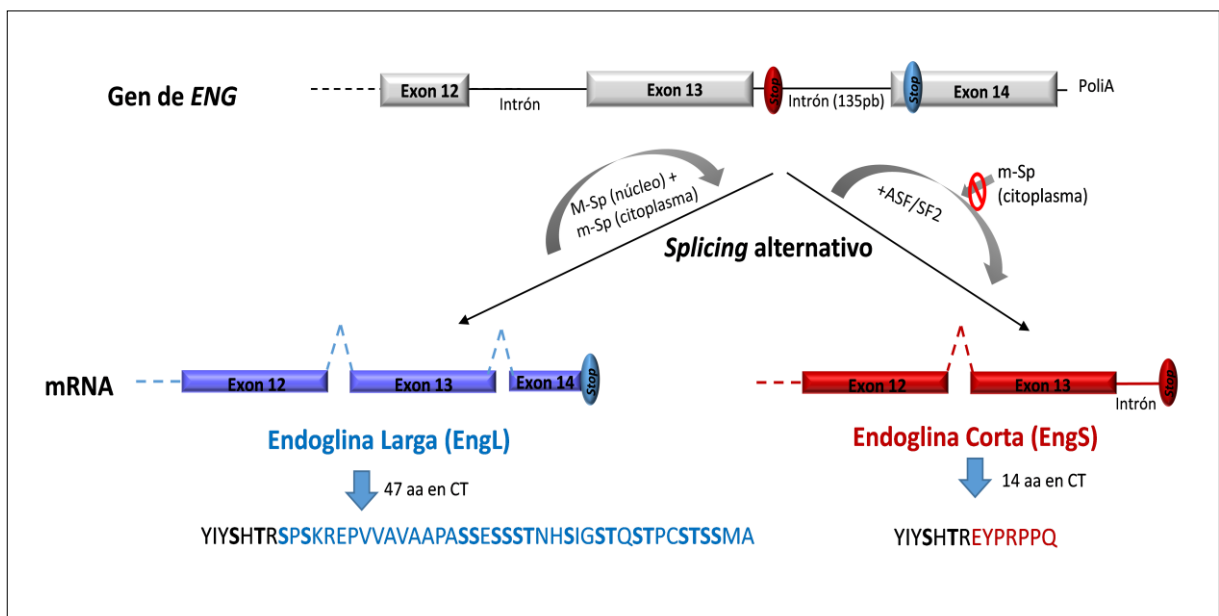
#### **6.4. Isoformas de endoglina**

Existen dos isoformas humanas distintas de endoglina generadas por ajuste (*splicing*) alternativo, la isoforma L (*Long*, EngL) con una longitud de 658 aminoácidos, y la isoforma S (*Short*, EngS) con una longitud de 625 aminoácidos. Ambas isoformas son idénticas en la región extracelular y transmembrana, sin embargo difieren entre sí en la longitud del tallo citoplasmático. Esta región intracelular la conforman 47 aminoácidos en la EngL y 14 aminoácidos en la EngS, de los cuales los 7 primeros son homólogos entre sí (Bellón y col., 1993). La existencia de estas dos isoformas también se han descrito en el modelo murino,

con una longitud de 653 aminoácidos para EngL y de 641 aminoácidos para EngS (Pérez-Gómez y col., 2005).

La EngS, al tener el tallo citoplasmático más corto, no contiene el dominio PDZ de interacción con otras proteínas y carece de algunos sitios potenciales de fosforilación como Ser<sup>621</sup>, por lo que la capacidad de fosforilación de EngS es hasta 8 veces menor que la EngL (Lastres y col., 1994).

La isoforma corta de endoglina se genera por ajuste alternativo, mediante retención de intrones. Es decir, en el RNA maduro de endoglina, el último intrón, situado entre los exones 13 y 14, no se elimina y, como consecuencia, se introduce un codón de parada prematuro y por tanto la traducción de una proteína más corta (Bellón y col., 1993; Blanco y col., 2008). Se ha descrito en nuestro laboratorio que la retención del intrón, durante la senescencia endotelial, se regula por el factor de ajuste alternativo ASF/SF2 (Blanco y Bernabeu, 2011). En este proceso, el factor ASF/SF2 se transloca del núcleo al citoplasma, interfiriendo con la maquinaria del spliceosoma menor, que suele procesar algunos de los mRNA que todavía presentan retención de intrones, impidiendo su accesibilidad al punto de ramificación y estabilizando por tanto la retención del intrón, que finalmente aumenta los niveles del mRNA de EngS.



**Figura 8. Mecanismo de procesamiento alternativo que da lugar a las dos isoformas de Endoglina.**

Se representa el gen de endoglina con sus exones e intrones. En condiciones normales, la maquinaria de transcripción que comprende el spliceosoma mayor (M-Sp) en el núcleo y el spliceosoma menor (m-Sp) en el citoplasma produce la eliminación de los intrones, y por tanto la transcripción de EngL hasta el codón de parada que se encuentra en el exón 14. La retención del intrón que se encuentra entre el exón 13 y 14 por ajuste alternativo



introduce un codón de parada prematuro que conduce a la traducción de la isoforma corta de endogлина (EngS). Este *splicing* alternativo se ha asociado a la senescencia, donde el spliceosoma menor no es capaz de eliminar el intrón 13, debido al complejo estable que se forma entre el factor ASF/SF2 y el mRNA, interfiriendo por tanto con su acción, estabilizando la retención del intrón y aumentando así los niveles de EngS. La secuencia de aminoácidos del tallo citoplasmático de cada isoforma está detallada, indicando en color negro los aminoácidos comunes entre ambas isoformas y en letra negra aquellos residuos susceptibles de ser fosforilados.

En cuanto a su función, se ha descrito que las isoformas L y S parecen tener efectos antagónicos. La endogлина corta que se induce durante la senescencia parece contribuir a las patologías vasculares del envejecimiento. Aunque EngS interacciona con ambos tipos de receptores de TGF- $\beta$  (ALK1 y ALK5) en la célula endotelial, su interacción es más fuerte con ALK5, potenciando esta vía e induciendo un aumento en PAI-1, una disminución en la proliferación celular y un aumento de producción de matriz extracelular (Velasco y col., 2008), proceso observado no sólo en células endoteliales, sino en mioblastos L6E9, que causa la fibrosis típica durante la senescencia celular. Simultáneamente, EngS inhibe la ruta de señalización a través de ALK-1, disminuyendo por tanto la expresión de Id1 e inhibiendo procesos de angiogénesis (Blanco y col., 2008; Velasco y col., 2008). En modelos murinos transgénicos con sobreexpresión de EngS se ha observado que ésta provoca hipertensión porque disminuye la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y aumenta la COX2, afectando, por tanto a la homeostasis vascular dependiente de NO y disminuyendo la capacidad de dilatación de los vasos sanguíneos (Blanco y col., 2008).

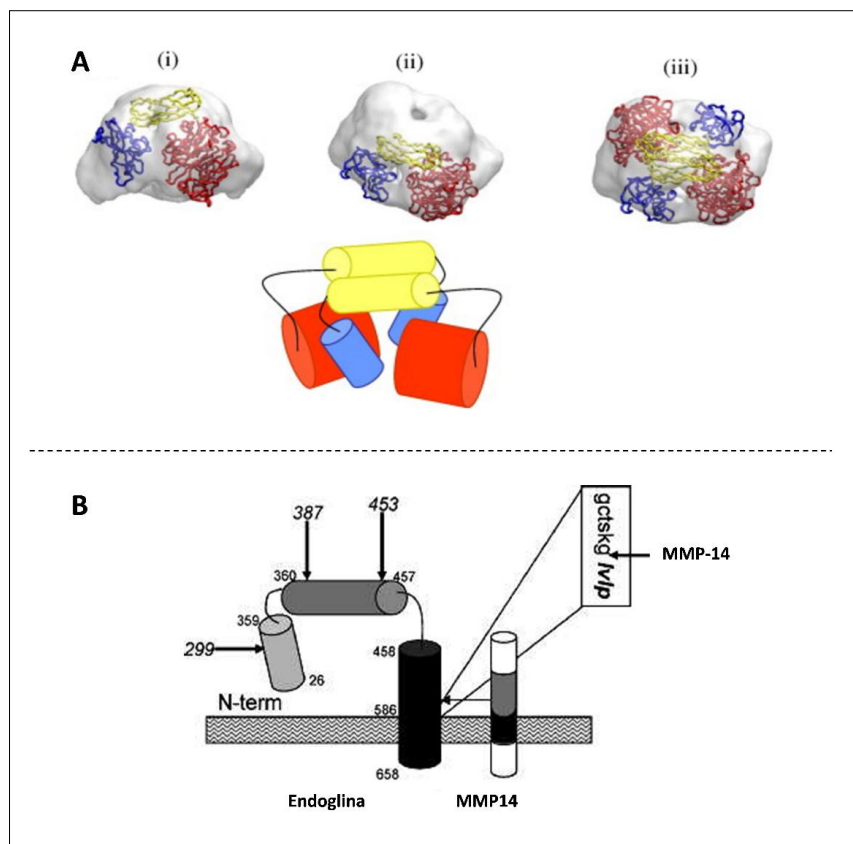
Conviene resaltar que la mayoría de los estudios que hoy en día se realizan se refieren a la endogлина larga ya que es la isoforma predominante, tanto en células endoteliales como en otros tipos celulares. La EngS, por el contrario, aumenta su expresión durante la senescencia de las células endoteliales (Blanco y col., 2008), en situaciones de estrés oxidativo y envejecimiento de macrófagos (Aristorena y col., 2014) y en hígado y pulmón de ratón (Pérez-Gómez y col., 2005).

### **6.5. Endogлина soluble**

Se ha descrito una tercera forma de endogлина de 65 kDa, la endogлина soluble, que se encuentra en el medio extracelular generada por un corte proteolítico de endogлина de membrana, producido por la metaloproteasa MMP14 o MT1, al igual que ocurre con el T $\beta$ RIII, betaglicano (Hawinkels y col., 2010; Velasco-Loyden y col., 2004; Valbuena-Díez y col., 2012).

Aunque existen cuatro sitios potenciales de corte por la MMP14 en la endogлина de membrana (Gly-Leu) en las posiciones 299, 387, 453 y 586 de la región extracelular, parece que la metaloproteasa corta en la posición yuxtamembrana 586, por lo que el tamaño de endogлина soluble es equivalente al del dominio extracelular de la endogлина de membrana (Hawinkels y col., 2010). En el 2007, nuestro grupo pudo determinar por primera vez, la estructura tridimensional de la región extracelular de endogлина mediante microscopía electrónica (Llorca y col., 2007).

Poco se ha descrito hasta la fecha en cuanto a la función de endogлина soluble, pero sí parece antagonizar la función de endogлина de membrana. No hay claras evidencias del efecto del aumento de endogлина soluble en sangre bajo determinados procesos fisiopatológicos. Sin embargo, algunos resultados indican que tiene un papel fundamentalmente antiangiogénico *in vitro* (Venkatesha y col., 2006; Hawinkels y col., 2010) e induce permeabilidad vascular e hipertensión *in vivo* (Venkatesha y col., 2006; Valbuena-Díez y col., 2012; Blázquez-Medela y col., 2010). Estudios recientes en un modelo de animal transgénico que sobreexpresa endogлина soluble han demostrado que su aumento no afecta a la expresión de determinados marcadores como eNOS, ICAM-1 y VCAM1 en aorta, indicando, por tanto, que probablemente existen otros factores, los cuales, en conjunción con la endogлина soluble, pueden provocar disfunción endotelial (Nemeckova y col., 2015; Jezkova y col., 2016; Rathouska y col., 2017). Datos más recientes indican que el aumento de endogлина soluble puede provocar una respuesta inflamatoria local, así como incrementar factores relacionados con la inflamación como NF $\kappa$ B e IL6 (Varejckova y col., 2017).



**Figura 9. Mecanismo de corte de endoglina y estructura tridimensional de la región extracelular.**

A: Se representa la predicción por microscopía electrónica de la estructura tridimensional de la región extracelular de endoglina. El dominio huérfano se representa en color rojo, el dominio zona pelúcida-N (ZP-N) en amarillo y el dominio ZP-C en azul. La estructura está incorporada en el modelo atómico del mapa de densidad según la predicción. Vista lateral (i) y vista superior (ii) de la estructura del monómero y vista del dímero de endoglina (iii). También se muestra una figura esquematizada con la organización de los dominios que conforman el dímero (Modificado de Llorca y col., 2007). B: Representación esquemática del monómero de endoglina y los sitios potenciales de corte por la MMP14 de membrana (299, 387, 453, 586). Parece que MMP14 corta endoglina de membrana en el sitio específico Gly-Leu 586-587, permitiendo la liberación de la región extracelular completa al medio (Adaptado de Hawinkels y col., 2010).

La endoglina soluble puede encontrarse tanto libre como unida a otros factores de la superfamilia de TGF- $\beta$ , como TGF- $\beta$ 1, BMP9 y BMP10, actuando así en determinados momentos críticos como *scavenger*, ya que secuestraría estos ligandos circulantes dificultando su unión a los receptores e inhibiendo, en rasgos generales, la activación de rutas angiogénicas y el aumento de eNOS (Venkatesha y col., 2006; ten Dijke y Arthur,

2007; Hawinkels y col., 2010; Castonguay y col., 2011; Rathouska y col., 2015; Gregory y col., 2014).

El aumento de los niveles de endoglina soluble en sangre está asociado a la severidad de diversas patologías: i) vasculares como preeclampsia en mujeres embarazadas (descrita en un apartado posterior), hipertensión, esclerosis sistémica, cardiomiopatía dilatada, infarto agudo de miocardio y aterosclerosis (Cruz-González y col., 2008; Nachtigal, 2012; Blázquez-Medela, 2010; Fujimoto y col., 2006); ii) inflamatorias y autoinmunes como esclerosis múltiple, psoriasis y artritis reumatoide (Karampoor y col., 2016; van de Kerkhof y col., 1998); y iii) tumorales como cáncer de mama metastático, cáncer colorectal, cáncer de pulmón, leucemia mieloide aguda y tumor de próstata (Li y col., 2000; Pérez-Gómez y col., 2007; Calabrò y col., 2003; Takashi y col., 2001). Este incremento se puede explicar por la activación de la angiogénesis e inflamación que se produce en condiciones patológicas y, por tanto, el aumento de la expresión y actividad de las metaloproteasas, que son las responsables de facilitar procesos de migración y, como consecuencia, el corte de endoglina de membrana.

Los niveles de endoglina soluble se presentan disminuidos en pacientes con cáncer de mama que reciben quimioterapia (Takahashi y col., 2001) por lo que no es fiable su uso como marcador pronóstico de esta enfermedad en pacientes tratados. Sin embargo, investigaciones recientes demuestran que endoglina soluble puede utilizarse como un marcador de pronóstico en tumores de esófago, estómago y ovario (Mysliwiec y col., 2009; Odegaard y col., 2008; Bellone y col., 2007), o como un indicador de diagnóstico, como ocurre en cáncer de próstata, donde niveles elevados de endoglina soluble encontrados en orina se correlacionan con los estadios más avanzados de la progresión tumoral (Fujita y col., 2009; Karam y col., 2008).

Paradójicamente, endoglina soluble es considerada, en rasgos generales, como un factor pronóstico negativo en algunos tipos de cánceres, mientras que, al mismo tiempo, cumple una función antiangiogénica en preeclampsia y otras enfermedades vasculares. Resolver esta contradicción y estudiar el efecto de la endoglina soluble a nivel vascular y tumoral es importante de cara a dilucidar su mecanismo de acción, así como para encontrar posibles terapias futuras. Precisamente, esta tesis se centra en dilucidar algunos aspectos de esta cuestión.

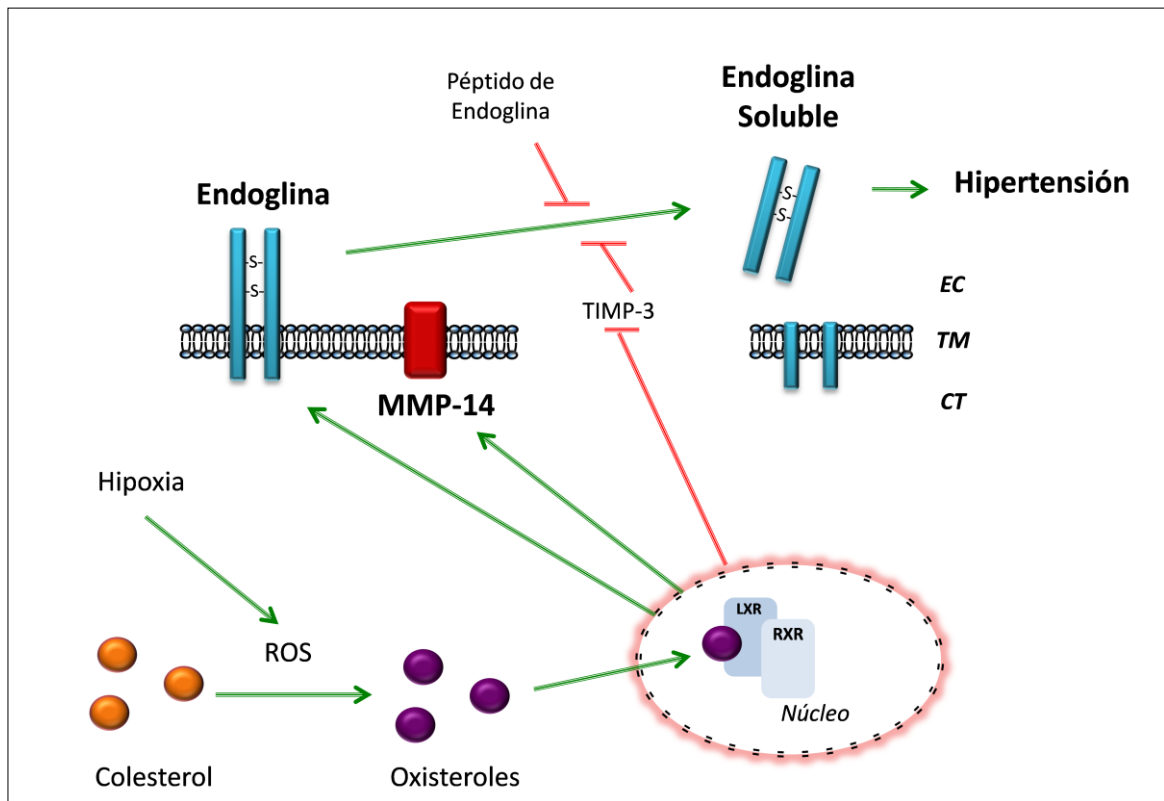
### **6.5.1 Preeclampsia, enfermedad asociada a endoglina soluble**

La preeclampsia es considerada un síndrome específico del embarazo y se define clínicamente por la presencia de hipertensión (presión diastólica >90 mmHg) y proteinuria ( $\geq 300$  mg de proteína al día) después de la semana 20 de gestación. Se trata de una enfermedad que afecta aproximadamente al 2-5% de las mujeres gestantes. El aumento de presión arterial puede llegar a causar morbilidad perinatal y mortalidad materna (Levine y col., 2006; Sibai y col., 2005).

En el desarrollo de una placenta normal, los citotrofbastos de origen fetal invaden las arterias espirales maternas, aumentando el calibre y la capacidad de estos vasos capaces de proveer sustancias adecuadas para la gestación. Durante este proceso de invasión celular, los citotrofbastos se diferencian de un fenotipo epitelial hacia un fenotipo endotelial, proceso conocido como “pseudovasculogénesis”. En preeclampsia, sin embargo, se produce un fallo en la adopción de este fenotipo endotelial invasivo por los citotrofbastos, provocando que las arterias espirales sean de un diámetro pequeño, dando lugar a los efectos clínicos típicos de esta enfermedad (Khong y col., 1986; Lam y col., 2005). Tanto la disfunción endotelial como la disfunción a nivel trofoblástico cumplen un papel clave en el desencadenamiento del proceso patogénico de la preeclampsia.

A nivel celular y molecular, la preeclampsia se caracteriza por un aumento en el suero de las pacientes de sFlt1 (forma soluble del receptor de VEGF) y endoglina soluble, ambas con función antiangiogénica, que están relacionadas con la severidad de la enfermedad (Levine y col., 2006; Venkatesha y col., 2006; Hagmann y col., 2012). Además se han encontrado niveles circulantes del factor PlGF y VEGF disminuidos, lo que amplifica esta función antiangiogénica (Lam y col., 2005).

En nuestro laboratorio se ha postulado un modelo que relaciona hipoxia con el aumento de endoglina soluble, de forma que altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidos por hipoxia promueven la formación de oxisteroles a partir del colesterol. Estos oxisteroles se unen de forma específica a los receptores LXR/RXR (receptor X de hígado, receptor X retinoide), estimulando la expresión de la metaloproteasa MMP14 a nivel de membrana. Como consecuencia del aumento de los niveles y actividad de MMP14, se produce el corte proteolítico de endoglina de membrana, aumentando la endoglina soluble en el medio extracelular. De hecho, esta endoglina soluble está relacionada con la hipertensión observada en los pacientes con preeclampsia (Valbuena-Díez y col., 2012).



**Figura 10. Modelo hipotético de generación de endogлина soluble en la homeostasis vascular.**

La hipoxia induce especies reactivas de oxígeno (ROS), que ayudan a convertir el colesterol en oxisteroles. Estos oxisteroles se unen específicamente al receptor LXR (receptor X de hígado)/RXR (receptor X retinoico), que suelen estar formando un dímero en el núcleo celular. Tras esta activación, aumentan los niveles de MMP14 y disminuyen los del inhibidor 3 de la metaloproteasa (TIMP-3). Como resultado, hay un aumento de actividad de MMP14 que corta la región yuxtamembrana de endogлина de membrana generando la forma soluble. Este aumento de endogлина soluble aumenta la presión arterial sistémica en ratones. El tratamiento con péptidos de endogлина sustratos de MMP14, disminuye la actividad de MMP14 sobre endogлина de membrana, inducida por los oxisteroles *in vivo*. Las regiones extracelular (EC), transmembrana (TM) y citoplásmica (CT), así como los puentes disulfuro (S-S) están indicados en el esquema (Adaptado de Valbuena-Díez y col., 2012).

Cada vez más evidencias apuntan al papel de estas proteínas antiangiogénicas como marcadores del diagnóstico clínico y predicción de preeclampsia. Investigaciones actuales buscan agentes farmacológicos que contrarresten los efectos de endogлина soluble y sFlt1 como tratamientos potenciales para la preeclampsia (Agarwal y Karumanchi, 2011; Steinberg y col., 2009).

## **6.6 Telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1 (HHT1). Enfermedad "rara" asociada a endogлина.**

La telangiectasia hemorrágica hereditaria, HHT o síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad genética autosómica dominante que afecta a 1 de cada 5.000 individuos. Se caracteriza clínicamente por la formación de estructuras vasculares anómalas que acaban produciendo epistaxis (sangrados recurrentes y espontáneos), telangiectasias en el septo nasal, mucosa oral, tracto gastrointestinal y dedos, entre otros, sangrados y anemia, así como malformaciones arteriovenosas (MAV) en distintos órganos (pulmón, cerebro e hígado) (Shovlin, 2010; Shovlin y col., 1997; McDonald y col., 2011, 2015).

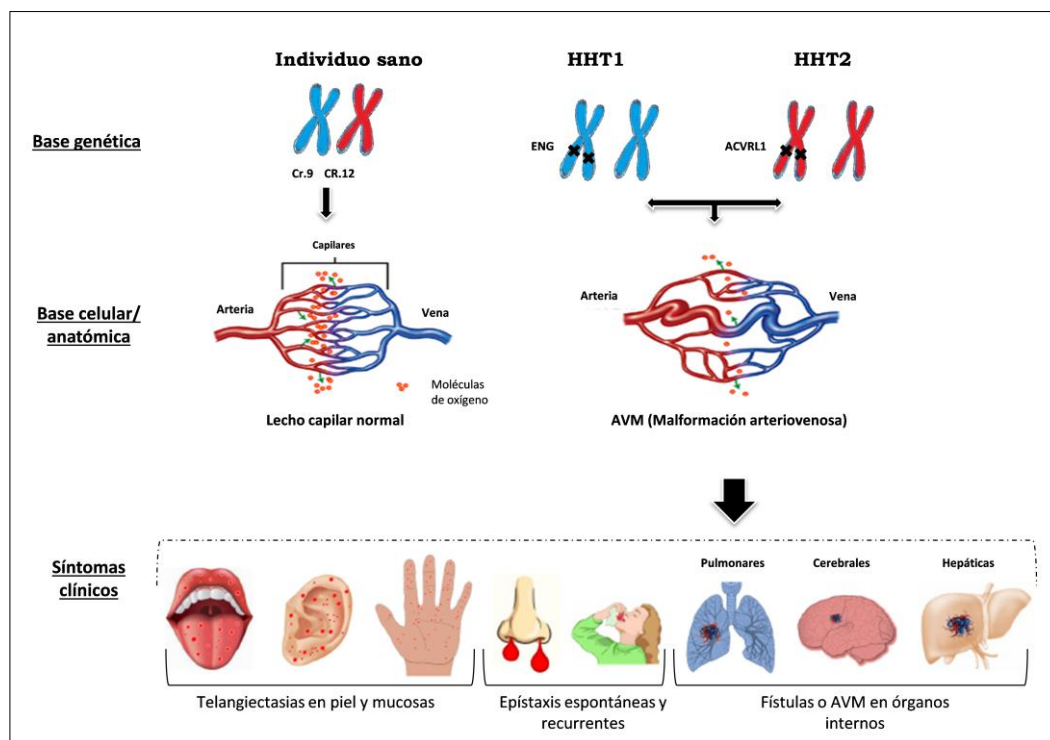
HHT es una enfermedad genéticamente muy heterogénea, ya que existen diferentes tipos según el gen que se encuentre mutado. Mutaciones en heterocigosis en el gen de endogлина (*ENG*), localizado en el cromosoma 9, dan lugar a la HHT1 (Fernández-Ruiz y col., 1993; McAllister y col., 1994) y mutaciones en el gen de *ACVRL1/ALK1* originan la variante HHT2 (Johnson y col., 1996). Más del 80-85% de los pacientes con HHT presentan mutaciones en los genes de *ENG* y *ACVRL1*.

Existen otras variantes de la enfermedad, la HHT3 y la HHT4, relacionadas con mutaciones en el cromosoma 5 y en el 7, cuyos genes aún no se han identificado (Cole y col., 2005; Bayrak-Toydemir y col., 2006a, 2006b). Mutaciones en el gen *MADH4/SMAD4* causan poliposis juvenil familiar asociada a HHT (Gallione y col., 2004) y mutaciones en *BMP9/GDF2* producen un síndrome similar a HHT o HHT5 (Wooderchak-Donahue y col., 2013).

En cuanto a la HHT1, existen alrededor de 500 mutaciones diferentes del gen de endogлина descritas hasta la fecha en la base de datos pública ([http://www.arup.utah.edu/database/ENG/ENG\\_welcome.php](http://www.arup.utah.edu/database/ENG/ENG_welcome.php)). Estas mutaciones afectan a la integridad de diferentes dominios de la proteína. Sólo el 20% están relacionadas con mutaciones de cambio de sentido, siendo la mayoría deleciones, inserciones y defectos en el ajuste, que conllevan la expresión de una proteína truncada que puede o no expresarse o mantenerse retenida intracelularmente, provocando la haploinsuficiencia proteica protagonista de esta enfermedad (Pece y col., 1997; Pece-Barbara y col., 1999; Cymerman y col., 2000; Paquet y col., 2001).

El diagnóstico de HHT se realiza siguiendo un juicio clínico conocido como “Criterios de Curaçao”, consistente en que tres de los cuatro criterios siguientes se cumplan: epistaxis o sangrados recurrentes, telangiectasias, malformaciones arteriovenosas localizadas en distintos órganos y sangrados gastrointestinales y, por supuesto, una historia familiar genética previa. Aunque generalmente estos síntomas se cumplen, la penetrancia de la enfermedad suele ser del 100% en la edad adulta (Shovlin, 2010; Faughnan y col., 2011).

Como consecuencia de la pérdida de expresión de endoglina, se produce una disfunción endotelial, que indirectamente afecta a la expresión de distintos genes, proteínas e incluso a posibles interacciones entre las células endoteliales y células musculares que recubren el vaso, resultando en debilitamiento de los vasos, integridad vascular pobre, malformaciones arteriovenosas y como consecuencia los típicos sangrados (Carvalho y col., 2004; Lebrin y col., 2010; Mahmoud y col., 2010).

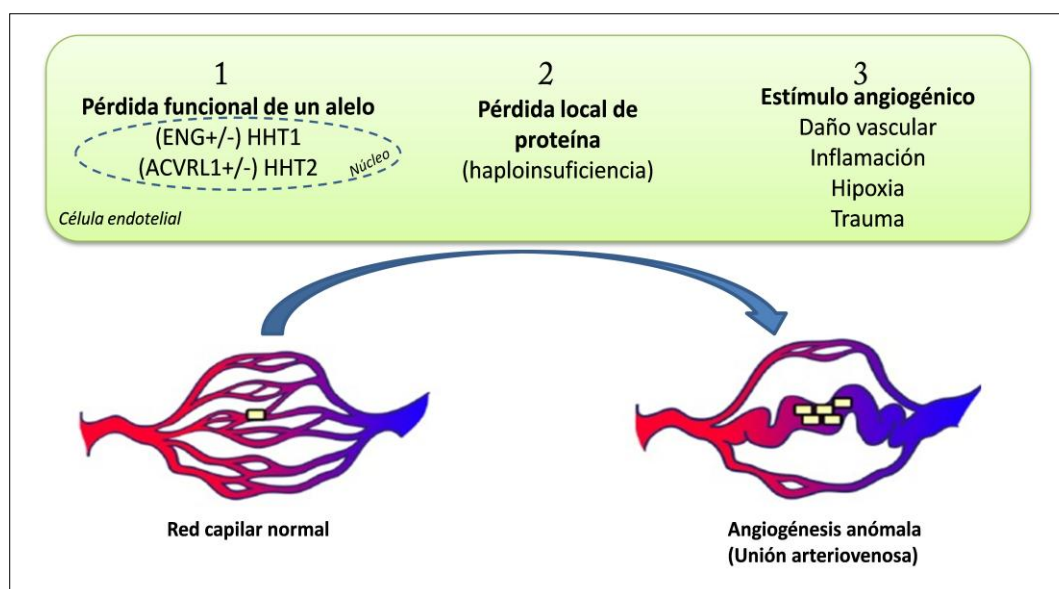


**Figura 11. Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) y sintomatología clínica asociada.**

Mutaciones en los genes de *ENG* o *ACVRL1* derivan en una haploinsuficiencia de las proteínas que codifican (Endoglina y ALK1). Como consecuencia, el balance de la señalización de TGF- $\beta$  en el endotelio se desregula, el citoesqueleto se desestructura, la pared vascular se vuelve frágil y la angiogénesis aumenta, produciendo la aparición de anomalías vasculares donde el calibre de los vasos está ensanchado y se pierde la morfología de la red capilar normal. La aparición de las malformaciones arteriovenosas tiene como consecuencia un menor intercambio de oxígeno y nutrientes en los tejidos. Estos mecanismos desencadenan la aparición de los síntomas clínicos típicos de esta enfermedad: telangiectasias en piel y mucosas, sangrados espontáneos y recurrentes y fístulas en órganos internos (cerebro, hígado, pulmón y tracto gastrointestinal).



El hecho de que en esta enfermedad las lesiones vasculares o MAV estén tan localizadas se explica gracias a la “Teoría del segundo evento”, también conocida como “Teoría de los tres eventos”. Es decir, no sólo es necesario una pérdida funcional de uno de los alelos del gen de *ENG* en la célula endotelial, sino que también se precisa de un segundo evento como hipoxia, heridas o inflamación que desencadene una angiogénesis. En el caso de HHT1, aunque se active la proliferación y migración de las células endoteliales, la formación del vaso es anómala por la disminución localizada de la proteína endoglina en las células endoteliales. Como consecuencia, desaparece la mayor parte de la red capilar por su fragilidad, aumentando el flujo sanguíneo y la presión, lo que produce un ensanchamiento de los vasos conectados, produciéndose de esta manera una retroalimentación positiva y progresiva (Tual-Chalot y col., 2015).

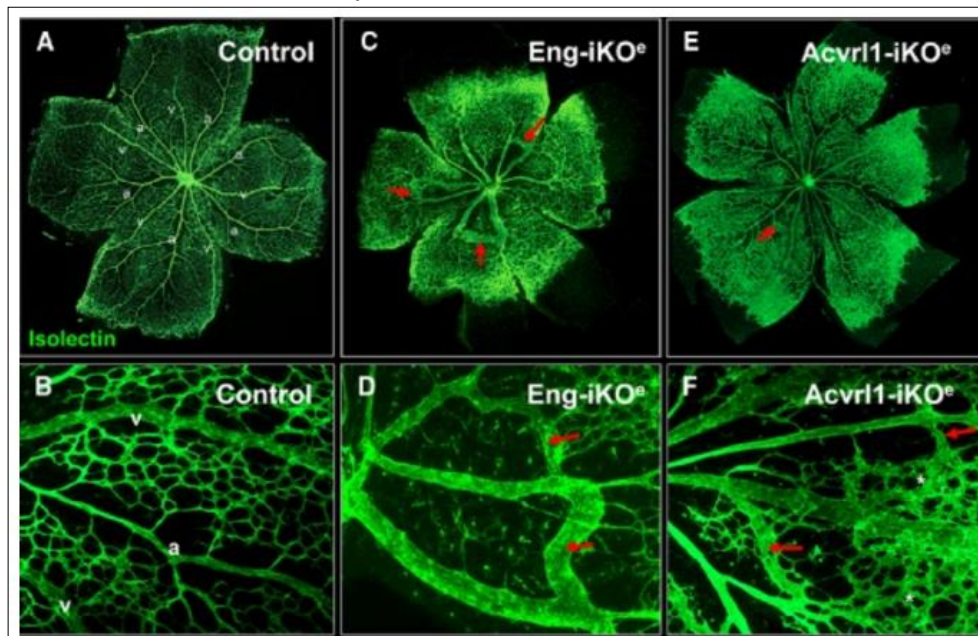


**Figura 12. Hipótesis de "los tres eventos" de formación de malformaciones arteriovenosas en HHT.**

Las células endoteliales de pacientes con HHT sufren una pérdida de expresión proteica local de endoglina o ALK1 debido a la mutación en heterocigosis de estos genes (*ENG*, *ACVRL1*). Una pérdida adicional de proteína puede ser debida al corte de la proteína de membrana o a mutaciones somáticas. Si los vasos que están formados por estas células endoteliales que no expresan en su totalidad la proteína, se exponen a estímulos proangiogénicos como inflamación, hipoxia, daños o desarrollo, las células proliferarán contribuyendo al ensanchamiento anómalo de los vasos. Una vez que el flujo sanguíneo se incrementa, existe una retroalimentación positiva que induce aún más la proliferación celular y el ensanchamiento del vaso (Adaptado de Tual-Chalot y col., 2015).

Con la finalidad de estudiar el papel de endoglina *in vivo* más detalladamente, tanto en el desarrollo como en los diferentes procesos angiogénicos, se han generado modelos animales murinos para HHT1. Estudios en este ratón han demostrado que endoglina es esencial para el desarrollo embrionario temprano, ya que la mutación en homocigosis provoca un fallo en la formación de vasos del saco vitelino y fallo en el progreso embrionario, causando una muerte prematura del embrión alrededor del día 10.5 *post-coitum*. Hoy en día existen diferentes modelos murinos generados: heterocigotos para el gen de endoglina, cuya penetrancia y fenotipo no es completa; y modelos *KO* (*Knock out*) inducibles para este gen, tanto a nivel sistémico como en determinadas líneas celulares (endoteliales y monocitos), lo que permite un estudio muy exhaustivo del efecto de la pérdida del gen y de la proteína endoglina (Arthur y col., 2000; Bourdeau y col., 1999; Li y col., 1999; Torsney y col., 2003; Allinson y col., 2007; Ojeda-Fernández y col., 2016).

Figura 13. Malformaciones arteriovenosas que se observan en retinas neonatales de ratones inducibles *KO* para



los genes *Eng* o *Alk1* específicos de la célula endotelial.

Se trata de un modelo muy utilizado para estudiar las malformaciones arteriovenosas que se producen en la enfermedad HHT. Las células endoteliales y el plexo vascular a día p7 post-natal están marcados con isolectina. En la retina control se observa la organización regular de capilares, venas y arterias (A, B). Tras una depleción específica endotelial de *Eng* mediante tratamiento con tamoxifeno en neonatos *Eng<sup>fl/fl</sup>; Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>* (*Eng-iKO<sup>e</sup>*), existe una progresión vascular retardada, así como múltiples MAV (C, D). La pérdida específica a nivel de endotelio del gen *Acvrl1* también se observa que da lugar a MAV, así como alargamientos de las venas (E, F) (Adaptado de Tual-Chalot y col., 2015).

Niveles alterados de proteínas séricas-plasmáticas, tanto en pacientes como en modelos animales murinos de HHT, se están utilizando como potenciales biomarcadores de esta

enfermedad (Botella y col., 2015), con la finalidad de facilitar la identificación rápida de un paciente sospechoso de padecer HHT; entre ellos se encuentran TGF- $\beta$ 1, VEGF, angiopoyetina 2 y endogлина soluble. En lo referente a TGF- $\beta$ 1, parece no haber unanimidad debido a que sus niveles dependen del fondo genético, ya que los pacientes con HHT muestran mayores o menores niveles de este factor dependiendo de la población de la que provengan (Sadick y col., 2005, 2006; Letarte y col., 2005). El factor VEGF se encuentra aumentado en pacientes con HHT, relacionando este factor proangiogénico con mayores sangrados gástricos y epítaxis (Cirulli y col., 2003; Sadick y col., 2005; Giordano y col., 2009). Los niveles de angiopoyetina se muestran disminuidos en pacientes de HHT, aunque sólo en HHT2, hay diferencias significativas con respecto a los sujetos sanos (Ojeda-Fernández y col., 2010; Fernández-L y col., 2007). Endogлина soluble se encuentra disminuida en pacientes HHT1, resultado de la haploinsuficiencia de endogлина de membrana (Abdalla y Letarte, 2006). Actualmente, se están realizando estudios con otros biomarcadores diferencialmente expresados en HHT como los microRNAs, como por ejemplo miRNA205 y miRNA27 que se encuentran disminuidos y aumentados en HHT respectivamente, así como miRNA210 que está relacionado con la presencia de malformaciones arteriovenosas pulmonares o PAVMs (Tabruyn y col., 2013; Zhang y col., 2013).

A nivel farmacológico se usan diferentes estrategias para normalizar la vasculatura y disminuir los sangrados, tanto nasales como gástricos. La estrategia del uso de antifibrinolíticos potencia la coagulación y se usa en una primera fase de tratamiento de los sangrados, siendo el tranaxémico el antifibrinolítico más utilizado (Fernández-L y col., 2007). Otro modo de actuación es la estimulación de la transcripción de los genes mutados en heterocigosis para compensar la haploinsuficiencia. En esta línea se ha demostrado que los estrógenos y los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM) estimulan la transcripción de *ENG* y *ACVRL1*. Tanto Raloxifeno como Bazedoxifeno, SERMs usados para la osteoporosis, tienen la designación de medicamentos huérfanos para sangrados en HHT (Albiñana y col., 2010; Zarrabeitia y col., 2016). Por último, la estrategia antiangiogénica intenta contrarrestar el exceso de vasculatura anómala para normalizarla. Se ha usado el Bevacizumab como anti-VEGF (Dupuis-Girod y col., 2012, 2016) y también se ha propuesto el propranolol como antiangiogénico (Albiñana y col., 2012; Whitehead y col., 2016). Dentro de esta estrategia antiangiogénica, uno de los objetivos de esta tesis ha

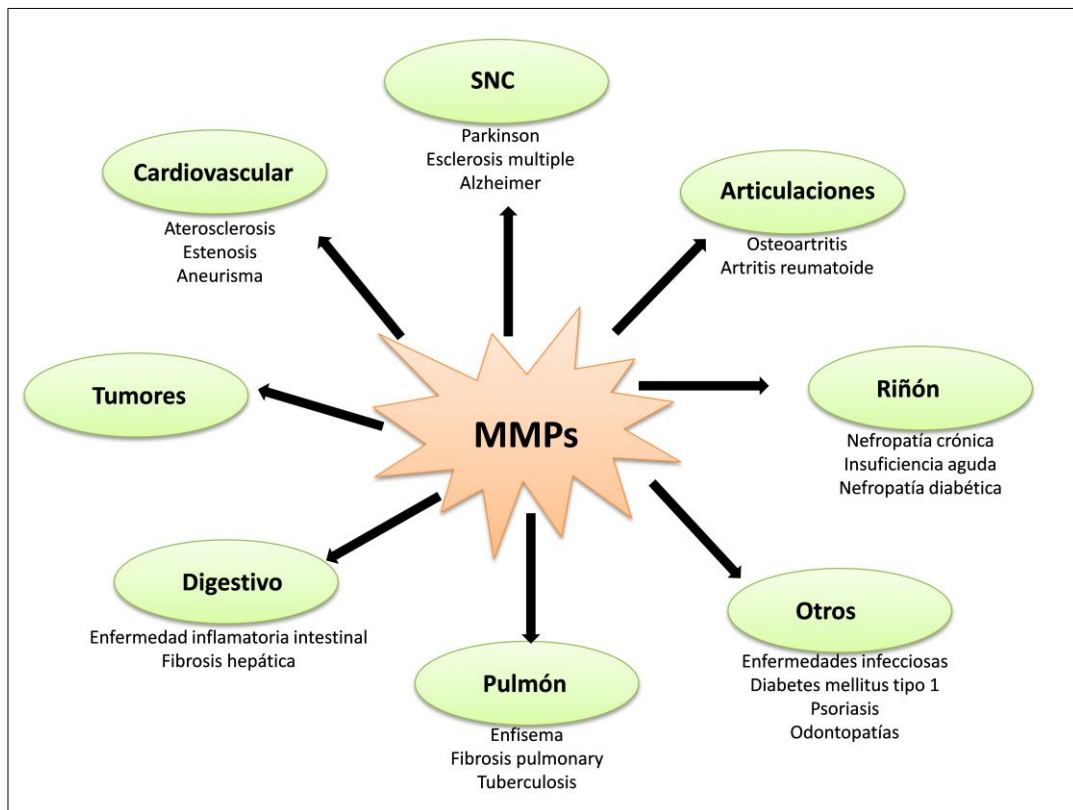
sido comprobar si la endoglina soluble descrita como antiangiogénica podría modular las malformaciones vasculares en HHT.

## 7. Metaloproteasas

Las metaloproteinasas de matriz, también conocidas como metaloproteasas, matrixinas o MMPs (*Matrix metalloproteinases*), son endopeptidasas secretadas o unidas a membrana

que forman parte de una importante familia de proteínas implicadas en diversos procesos biológicos, entre los que se incluyen angiogénesis, accidentes cerebrovasculares, reparación vascular, inflamación y cáncer (Davis y Senger, 2005; Rundhaug, 2005; Mott y Werb, 2004; Yang y Rosenberg, 2015). Esta familia consta de 23 miembros en humanos identificados hasta la fecha y se expresan prácticamente en todos los tejidos y órganos (Khokha y col., 2013; Klein y Bischoff, 2011). Son conocidas por su capacidad de degradar y cortar componentes de la matriz extracelular, contribuyendo al remodelado de los tejidos, aunque cada vez más estudios indican que las metaloproteasas son capaces de cortar e incluso activar sustratos no relacionados con la matriz, incluyendo citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, receptores de señalización y otras proteínas de membrana.

Se pueden involucrar en funciones homeostáticas, como remodelado tisular, remodelado vascular y reparación de heridas (Stetler-Stevenson, 2008a; Kessenbrock y col., 2010). Además durante la angiogénesis, las metaloproteasas, entre las que se destaca la MMP14, juegan un papel clave en la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la migración de las células endoteliales y la invasión vascular. Un aumento en la actividad de las metaloproteasas está asociado con patologías vasculares como hipertensión, estenosis, malformaciones vasculares y aterosclerosis (Page-McCaw y col., 2007; Wang y col., 2015), con patologías inmunitarias como artritis y otros procesos inflamatorios/infecciosos (Pap y col., 2000; Jackson y col., 2014), con patologías neurodegenerativas, como esclerosis múltiple, Parkinson y Alzheimer (Benesová y col., 2009; He y col., 2013; Horstmann y col., 2010), con procesos fibróticos en hígado y riñón (Benyon y Arthur, 2001; Duarte y col., 2015), y con distintos tipos de cáncer (Egeblad y Werb, 2002; López-Otín, 2009).



**Figura 14. Esquema general de implicación de las metaloproteasas en diversas enfermedades.**

Aunque no están detalladas todas las enfermedades relacionadas, se han detallado, a grandes rasgos y de una manera esquemática, las patologías sobre todo no tumorales, donde las metaloproteasas cumplen una función importante, tanto inhibiendo como activando los diversos procesos patológicos (Figura modificada de Tokito y Jougasaki, 2016).

Existen diferentes maneras de clasificar las metaloproteasas, en función de su estructura (Verma y Hansch, 2007) y en relación a la especificidad de sustrato y localización celular. De acuerdo a esta última clasificación, se pueden diferenciar en colagenasas, gelatinasas, estromalinas y metaloproteasas asociadas a membrana (MT-MMPs). Todas ellas tienen una alta homología en cuanto a su estructura, contando la mayoría con los cuatro dominios básicos: péptido señal, prodominio autoinhibitorio, dominio catalítico y dominio hemopexina. El péptido señal es responsable del proceso de secreción, es decir, del tráfico de la metaloproteasa desde el retículo endoplasmático hasta la membrana o exterior de la célula. El prodominio autoinhibitorio mantiene la metaloproteasa inactiva o latente porque contiene un residuo de cisteína que coordina la unión de un ión de zinc en el sitio catalítico (Nagase, 1997). El dominio catalítico es responsable de la actividad proteolítica. El dominio hemopexina media la especificidad de sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos. En el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (MT-MMPs)

contienen, además, un dominio transmembrana (Tokito y col., 2016; Bourbonliu y Stetler-Stevenson, 2010).

Las MMPs son enzimas pleiotrópicas. Su actividad proteolítica sobre sustratos de matriz y de no matriz puede regular la estructura tisular, facilitando la activación de la migración celular. Pueden, además, mediar el estado activo y la liberación de determinados factores, así como cortar dominios extracelulares de receptores de membrana que tienen en muchos casos su propia actividad biológica (Page-McCaw y col., 2007; Giannelli y col., 1997; Xu y col., 2001).

Las metaloproteasas pueden inhibirse tanto por inhibidores generales de éstas ( $\alpha_2$ macroglobulina), como por sus inhibidores específicos o TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). La familia TIMPs consta de cuatro miembros, TIMP 1, 2, 3 y 4, que se unen a las metaloproteasas en una relación 1:1 inhibiéndolas de forma reversible. Además de su actividad inhibitoria, las TIMPs pueden cumplir otras funciones biológicas involucradas en proliferación celular, apoptosis, angiogénesis e incluso activación de las proMMPs latentes (Nalluri y col., 2015; Murphy, 2011; Valacca y col., 2015).

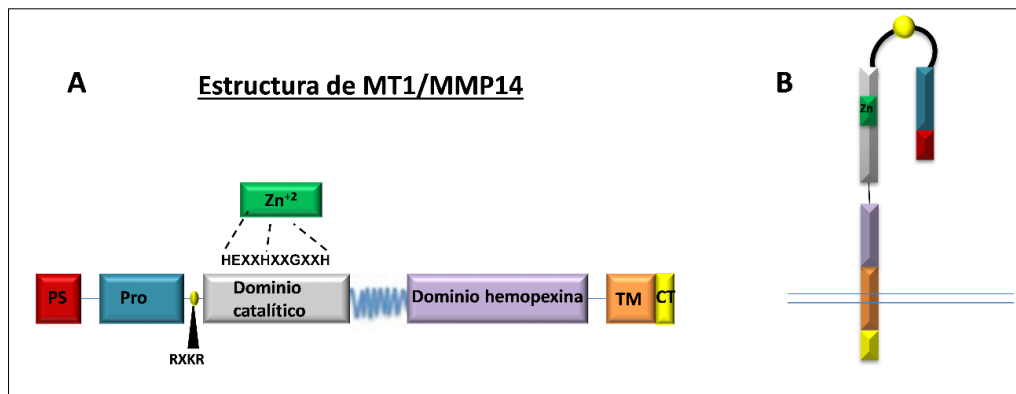
Cabe destacar que el balance MMP/TIMP resulta esencial en el mantenimiento de las situaciones fisiológicas normales y que un desequilibrio puede estar relacionado con procesos de invasión, tumorigénesis y metástasis (Lambert y col., 2004; Baker y col., 2002; Stetler-Stevenson, 2008b; Mittal y col., 2016; Cui y col., 2017). Por esta razón el estudio de la activación de rutas de señalización o factores relacionados con las MMPs, son de vital importancia en la búsqueda de tratamientos para distintas enfermedades.

### **7.1. MMP14 o MT1 (Metaloproteasa de matriz 14).**

La MMP14, conocida también como metaloproteasa de membrana tipo 1 (MT-MMP) pertenece al grupo de collagenasas pericelulares transmembrana de tipo 1. Su estructura contiene los cuatro dominios típicos, y como ya se ha comentado anteriormente, el dominio transmembrana que permite su anclaje a la membrana de la célula (Bourbulia y Stetler-Stevenson, 2010). En cuanto a su función, la MMP14 está involucrada en diferentes procesos vasculares: formación de capilares, observados usando matrices de colágeno en 3D (Davis y Senger, 2005; Haas y Madri, 1999); en respuestas inflamatorias de células endoteliales (Koziol y col., 2012); en la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica (Ray y col., 2004; Johnson y col., 2014); en la comunicación entre células de la membrana



respiratoria basal y células endoteliales (Ding y col., 2015); y, sobre todo, en procesos angiogénicos, de migración endotelial y de cáncer. Además la MMP14 aparece aumentada en los vasos sanguíneos alrededor de una herida en comparación con los vasos de piel humana intacta (Roy y col., 2006; Hiraoka y col., 1998).



**Figura 15. Estructuras esquemáticas de la metaloproteasa MMP14 o MT1.**

**A:** Se especifican los distintos dominios de la MMP14, el péptido señal (PS), el propéptido (Pro), el dominio catalítico, el dominio hemopexina, el dominio transmembrana (TM) y el dominio correspondiente a la región citoplasmática (CT). **B:** Representación esquemática de la MT-MMP14, anclada a la membrana a través del dominio transmembrana. El círculo amarillo representa la región de corte para la convertasa, que es la encargada de la activación de la MMP (Adaptado de Bourbonliua y col., 2010; Tokito y col., 2010).

Actualmente se están reportando nuevas funciones para la MMP14, como pueden ser, la interacción con nuevos sustratos proteolíticos y su actuación incluso como molécula de adhesión para la unión de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos, integrinas, cadherinas y CD44 (Koziol y col., 2012; Lu y col., 2014). Además de degradar el colágeno que está alrededor de las células vasculares nuevas (van Hinsbergh y col., 2006), la MMP14 participa en la liberación de TGF- $\beta$ 1 latente a partir del LTBP o TGF- $\beta$  latente unido y activa otras metaloproteasas que se secretan al medio, como MMP2, que cumple un papel fundamental en el proceso de invasión tumoral mediado por angiogénesis (Lu y col., 2014). Recientemente además se ha descubierto que no sólo existe la forma transmembrana de MMP14 capaz de cortar receptores como endoglina de la célula endotelial, ya descrito en apartados anteriores (Hawinkels y col., 2010), sino que existe una forma soluble de MMP14 derivada de células estromales de médula ósea que es capaz de cortar también este receptor en células tumorales de cáncer de mama, modulando su actividad y su capacidad migratoria (Tobar y col., 2014).



## 8. Familia KLF (*Krüppel like factor*)

La familia *Krüppel Like Factor* (KLF) es una familia de factores de transcripción que regula diversos procesos biológicos que incluyen proliferación, diferenciación, transducción de señales, desarrollo, supervivencia y respuesta a estrés externo (McConnell y Yang, 2010; Andreoli y col., 2010; Nandan y Yang, 2009; Jiang y col., 2008). Varios estudios apoyan el papel tan importante de esta familia en la biología vascular (Atkins y Jain, 2007; Suzuki y col., 2005).

La nomenclatura de esos factores está basada en la homología que existe en el dominio de unión a DNA con la proteína Krüppel de *Drosophila*. Krüppel proviene a su vez de la palabra alemana *Cripple* que significa incapacitado. Esta adaptación del nombre ocurrió porque en los modelos homocigotos para la proteína Krüppel de *Drosophila*, tenían los segmentos torácicos y abdominales alterados durante el desarrollo impidiendo que llegase a término (Preiss y col., 1985; Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). El primer factor de la familia Krüppel descubierto fue el KLF1 o EKLF (*Erythroid Krüppel-like factor*) por haberse identificado en los eritrocitos (Miller y Bieker, 1993), y a día de hoy se sabe cumple un papel importante en el desarrollo de estos glóbulos rojos (Nuez y col., 1995). A partir de éste, la nomenclatura que se le ha asignado a cada uno de los factores encontrados, ha sido en base al orden cronológico de descubrimiento (Atkins y Jain, 2007).

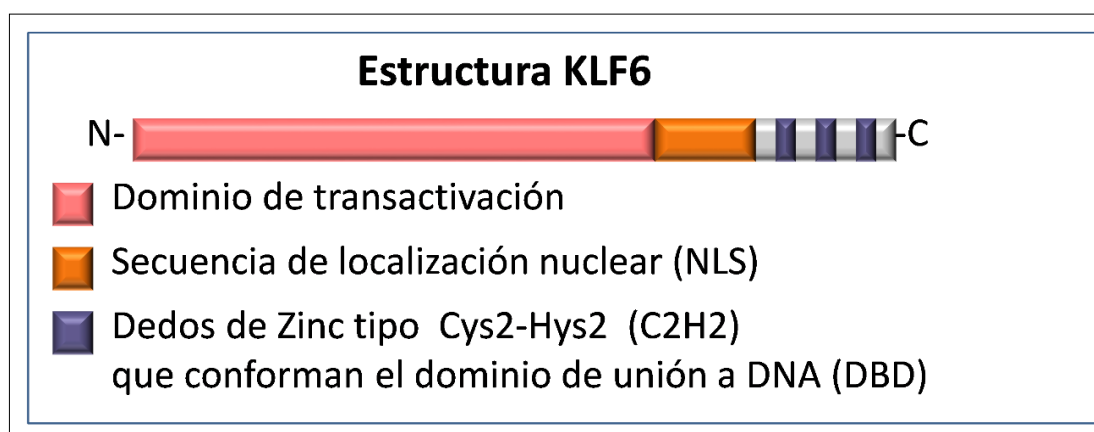
Los KLFs representan un conjunto de reguladores muy diverso en los vertebrados, de al menos 17 miembros en humanos, además de 9 proteínas de especificidad (Sp), que comparten un dominio similar de unión a DNA. Por esta razón, reciben el nombre de “Familia Sp/KLF”.

En cuanto a su estructura, la mayor parte de la familia KLF se caracteriza por un dominio de unión a DNA muy conservado (grado de conservación >65%), cuya secuencia es TGEKP(Y/F)X, compuesto por tres dedos de zinc localizados en la región C-Terminal (Kaczynski y col., 2003; Wierstra, 2008; Dang y col., 2000; Suske y col., 2005). Como resultado, se unen preferentemente a los “elementos CACCC” o “cajas GC” de los genes diana. Además, cada uno de los miembros de esta familia contiene secuencias de aminoácidos poco homólogos entre ellos, proporcionándoles una especificidad en su actividad regulatoria-transcripcional y de expresión tisular (Pearson y col., 2008).

Entre los miembros más destacados de la familia KLF que tienen relación con el endotelio, se encuentran KLF2, uno de los más estudiados hasta la fecha, KLF4 y KLF6, este último detallado a continuación (Atkins y Jain, 2007; Yet y col., 1998; Kuo y col., 1997; Kojima y col., 2000; Botella y col., 2002).

### **8.1. KLF6 y su importante implicación en el endotelio.**

KLF6 es un factor perteneciente a la familia *Krüppel like factor*, que fue identificado inicialmente en placenta (Koritschner y col., 1997). En esos años se descubrió que las células estrelladas activadas del hígado inducían rápidamente la expresión de KLF6 ante una fibrosis hepática, por lo que se pudo implicar en el daño celular (Ratzu y col., 1998; Lalazar y col., 1997). También se conoce con los nombres de Zf9, COPEB (*COre Promoter Element Binding Protein*) o GBF (*GC-rich sites Binding Factor*).



**Figura 16. Representación esquemática de la estructura de la proteína KLF6.**

El dominio ácido o dominio de transactivación se localiza en la región N-terminal y es necesario para ejercer su actividad transcripcional. El dominio central es rico en serinas y treoninas que pueden ser dianas potenciales de modificaciones postraduccionales y susceptibles de ser fosforiladas. La región C-terminal contiene estructuras tipo dedos de Zinc, ricas en Cys-His involucradas en la unión al DNA, a las secuencias ricas en GC o CACCC de distintos genes diana (Modificado de Andreoli y col., 2010).

Numerosos estudios describen por una parte, que se han encontrado alteraciones genéticas y mutaciones de KLF6, disminuyendo su expresión, en diferentes tipos de cáncer (Zhang y col., 2010; Wang y col., 2010), y por otra parte, que su expresión se encuentra aumentada en otros tumores como próstata y pulmón (Bureau y col., 2009; Ito y col., 2004; Huang y col., 2008), actuando de forma directa sobre la activación e inhibición de la proliferación celular (Trucco y col., 2014; Narla y col., 2001).

KLF6 está considerado como un factor con una importante función en procesos como desarrollo vascular, remodelado y respuesta a daño, ya que es capaz de transactivar diversas dianas endoteliales mediante su unión directa a promotores (McConnell y col., 2010). En este aspecto, en nuestro laboratorio se ha descrito que tras un daño endotelial, la expresión de KLF6 aumenta y se transloca al núcleo para activar la transcripción de forma específica de endoglina y ALK1 (Garrido-Martín y col., 2013; Botella y col., 2002), que como ya se ha explicado anteriormente en esta sección, son dos receptores de TGF- $\beta$  claves en el remodelado vascular y angiogénesis (Mahmoud y col., 2011). Igualmente se han visto activados otros factores y receptores pertenecientes al sistema de TGF- $\beta$ , como es el caso de TGF- $\beta$ 1, el receptor TGF- $\beta$  tipo II y el receptor TGF- $\beta$  tipo I ALK5 (Kojima y col., 2000; Kim y col., 1998). Además, KLF6 también tiene como diana un conjunto de genes implicados en la motilidad e invasión celular durante el remodelado vascular incluyendo el colágeno  $\alpha$ 1, E-cadherina, MMP9, PAI-1, IL6 y VEGF entre otros (McConell y col., 2010; Atkins y Jain, 2007; Das y col., 2006; Garrido-Martin y col., 2013; Bao y col., 2009). Cabe destacar que los ratones *Knock-out* de *Klf6* son letales en fase embrionaria debido a un fallo en la eritropoyesis y en la vascularización del saco vitelino (Matsumoto y col., 2006). En conjunto, todos estos datos señalan que KLF6 es un regulador crucial en la angiogénesis y remodelado vascular, razón que se ha tenido en cuenta para su estudio en uno de los objetivos de esta tesis.

# ***OBJETIVOS***

*Cuando el objetivo te parezca difícil,  
no cambies de objetivo;  
busca un nuevo camino hacia él.*

*(Confucio)*



## II. OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis doctoral ha sido el estudio de la expresión de endoglin soluble durante el daño endotelial, así como su función sobre los procesos de angiogénesis y remodelado vascular asociados con el daño endotelial.

Los objetivos concretos de la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

**Objetivo 1:** Estudiar el efecto *in vitro* del daño endotelial sobre la regulación de la expresión en la membrana celular de la metaloproteínasa MMP14 y de endoglin, así como la liberación de endoglin soluble.

**Objetivo 2:** Análisis descriptivo del efecto *in vitro* de endoglin soluble sobre proteínas y genes endoteliales implicados en angiogénesis.

**Objetivo 3:** Estudio del efecto de endoglin soluble sobre proteínas angiogénicas en células endoteliales *iKO* para *Eng*, y sobre la generación de malformaciones arteriovenosas producidas en retinas de un modelo murino de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1



# *MATERIALES Y MÉTODOS*

*Me lo contaron y lo olvidé,*

*Lo vi y lo entendí,*

*Lo hice y lo aprendí*

*(Confucio)*





### III. MATERIALES Y MÉTODOS

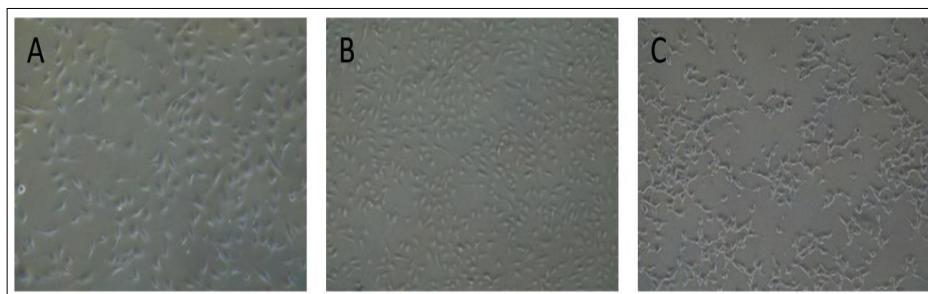
#### 1. Cultivos celulares.

Para la realización de este trabajo se utilizaron tanto líneas celulares inmortalizadas, como cultivos primarios de células. Todos los tipos celulares utilizados en esta tesis, y los nombres utilizados para cada uno de ellos, están recogidos en la **Tabla 7**, que se encuentra al final de esta sección de "Materiales y Métodos".

El cultivo primario de células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano (HUVECs, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; obtenidas de LONZA) se realizó sobre placas pre-tratadas con gelatina bovina (Sigma) diluida al 0,2% en solución salina de fosfato (PBS) durante 30 minutos a 37°C, para equiparar las condiciones de adhesión a una matriz extracelular. Estas HUVECs se cultivaron en medio básico endotelial EBM2 (*Endothelial Basic Medium*) suplementado con medio de crecimiento endotelial EGM2 (*Endothelial Growth Medium*; Lonza). Todos los experimentos que se hicieron con las células primarias de HUVECs se realizaron entre los pases 3-8 con la finalidad de que sus condiciones metabólicas y celulares fuesen similares. (**Figura 17A**).

La línea celular inmortalizada de microvasculatura endotelial humana (HMEC-1, *Human Microvascular Endothelial Cells*) (Ades y col., 1992) se cultivó sobre placas, pretratadas con gelatina bovina al 0,2% en PBS, en medio MCDB131 (Gibco) suplementado con 1ng/mL de EGF (*Epidermal Growth Factor*) y 1µg/mL de hidrocortisona (**Figura 17B**). La línea celular inmortalizada de epitelio de riñón embrionario humano HEK293T (*Human Epitelial Kidney Cells*) se cultivó en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Gibco) (**Figura 17C**).

**Figura 17.** Imágenes de los cultivos celulares descritos.



**A:** Cultivo primario HUVECs. **B:** Línea celular HMEC-1. **C:** Línea celular HEK293T. Imágenes tomadas con microscopio óptico a 5X aumentos.

Todos los cultivos celulares se incubaron de forma rutinaria a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo fueron complementados con: 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*; Gibco) a menos que se indique lo contrario; 2mM L-glutamina; 100U/mL de penicilina y 100ug/mL de estreptomicina (Gibco). Durante el mantenimiento de los cultivos celulares se utilizó PBS como medio de lavado. Para hacer los pases de células, éstas se despegaron de la placa tras incubación a 37°C con 0,05% tripsina/0,02% EDTA durante 3 minutos.

Para los ensayos con las proteínas recombinantes humanas endoglina soluble (solEng) o IL-6, se utilizaron distintas concentraciones y tiempos, según se indica en cada experimento. Ambas proteínas se obtuvieron de R&D Systems y se reconstituyeron, tal como recomienda el fabricante, en PBS con 0,1% BSA (endoglina soluble) o en PBS (IL-6). Los tratamientos se realizaron en el medio específico para cada tipo celular con 0%-2% de FBS, según se indique.

## 2. Ensayos de migración celular y angiogénesis.

### **2.1 Ensayo de migración celular mediante daño endotelial *in vitro*.**

Para los ensayos de cierre de herida (*Wound healing*) o daño endotelial, las células HUVECs fueron sembradas hasta llegar a confluencia en placas P24 preincubadas con 0,2% de gelatina. La herida se creó con una punta de pipeta, rayando en condiciones de esterilidad la monocapa de células y dejando un espacio entre las células de una anchura homogénea. Tras la herida, las placas se lavaron una vez con PBS para eliminar las células despegadas y se añadió medio nuevo completo, o medio con 2% de suero más el tratamiento. La migración endotelial se monitorizó midiendo la anchura que va quedando a distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas) entre las células que migran o los bordes de la herida. Su cuantificación se realizó con el programa *ImageJ* (Schneider y col., 2012). En el caso de los experimentos previos a la inmunoprecipitación de cromatina o inmunodetección de proteínas, se realizaron múltiples heridas en una placa p100 sembrada a confluencia de HUVECs, con el objetivo de dañar el mayor número de células posibles y así tener el mayor número de células activadas con un fenotipo migratorio.

## **2.2 Ensayo de formación de tubos sobre Matrigel.**

Para el ensayo de formación de tubos o tubulogénesis,  $8 \times 10^4$  HUVECs se sembraron por cada pocillo de p24 a 37°C en medio EBM2/EGM2 con antibióticos y 2% FBS. Estos pocillos eran previamente cubiertos por 100  $\mu$ L de Matrigel (BD Bioscience) diluido en proporción 1:2 en EBM2 (Lonza) sin FBS. Los tratamientos (diferentes concentraciones de solEng y/o 10ng/mL de VEGF) se añadieron tanto a la mezcla Matrigel/EBM2, como al medio EBM2 con las células endoteliales en suspensión. Se tomaron fotografías, con la cámara *Olympus Digital Camera* acoplada al microscopio, a las 3h y a las 6h de la formación de tubos. La cuantificación se realizó contando los tubos totalmente cerrados con ayuda del programa informático *Adobe Photoshop CS3* y los valores obtenidos fueron normalizados frente a la condición control.

## **3. Medida de proliferación mediante la sonda CFSE.**

El CFSE (Carboxifluoresceína succinimidil éster) es un método estándar en biología celular para medir proliferación, ya que marca covalentemente moléculas de larga vida celular. Una vez marcado el cultivo, la fluorescencia por célula se va perdiendo porque al dividirse las células, las proteínas marcadas se reparten entre las 2 células hijas. Por lo tanto con este método se relaciona una mayor proliferación con una menor fluorescencia celular. En nuestro caso, las células endoteliales HUVECs tanto en monocapa y sin herida, como a distintas horas después de realizarles la herida, se lavaron con PBS y se incubaron con la sonda CFSE diluida 1:10000 en PBS1X durante 10 minutos a 37°C, en oscuridad y en agitación suave. Debido a la acción de las esterasas, la sonda emite fluorescencia. La reacción se bloqueó añadiendo medio completo. Las células marcadas se levantaron y centrifugaron para obtener un pellet celular. Posteriormente se procedió al lisado celular con buffer de lisis (1% NP40; 150mM NaCl; 50mM Tris; 0,5mM NaF; 1mM PMSF; e inhibidores de proteasas y fosfatasas) durante 30 minutos de incubación. Este lisado se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos y finalmente en el sobrenadante se midió la fluorescencia a una  $\lambda$  de 520nm. Los niveles de fluorescencia detectados, se correlacionaron con el porcentaje de células a distintas horas del ensayo, lo que permitió dilucidar el porcentaje de proliferación.

## 4. ELISA.

Los niveles de proteínas solubles humanas (solEng, IL-6 y BMP4) presentes en el sobrenadante de HUVECs se determinaron por ELISA. Esta técnica se basa en una fase sólida donde un anticuerpo monoclonal, que se encuentra inmovilizado en la superficie de los pocillos de una placa p96 reacciona con la muestra y captura el antígeno de interés. El antígeno unido es a su vez reconocido por otro anticuerpo monoclonal acoplado a la enzima peroxidasa de rábano o HRP (*Horseradish peroxidase*). Esta HRP reacciona con la mezcla de sustratos cromogénicos estabilizados que son TMB (tetrametil-bencidina) y peróxido de hidrógeno, dando como resultado un producto coloreado azul. A los 30 minutos de incubación se detiene la reacción con una solución de ácido sulfúrico 2N virando el color a amarillo. A más color, más concentración de proteína. Cada uno de los análisis y calibraciones se realizaron mínimo por duplicado, siguiendo las instrucciones del fabricante. La densidad óptica de todos estos ensayos se midió a una longitud de onda de 450nm en el lector de placas *GloMax multimicroplate Detection System* (Promega) y las concentraciones finales se determinaron mediante interpolación con la curva estándar. Finalmente, los valores fueron normalizados respecto al porcentaje de células o proteína de los pocillos sin herida o control, según el experimento. (Proceso esquematizado en la **Figura 18**).

Para analizar los niveles de solEng y de IL-6 durante el proceso migratorio, se realizaron varias heridas por pocillo sobre la monocapa confluyente de HUVECs y a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 24h) se recogieron los sobrenadantes, que se centrifugaron con el fin de eliminar restos de células muertas y se utilizaron para hacer los ensayos de determinación de niveles de proteína con los kits comerciales de ELISA. Los niveles de endoglina soluble humana se midieron con el producto comercial *Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit* (DNDG00; R&D Systems) con el que se detectan niveles de solEng en un rango de 0,2-10 ng/mL. Los niveles de IL-6 humana se midieron con el kit comercial *Human IL-6 Quantikine ELISA Kit* (D6050; R&D Systems) con el que se detectan niveles de IL-6 en un rango de 3-300 pg/mL. La endoglina soluble se midió también en el medio de cultivo de HUVECs y células HEK293T previamente transfectadas con los diferentes vectores de expresión, tal como se indica más adelante. Para analizar los niveles de BMP-4 humana, la monocapa de HUVECs se trató con diferentes concentraciones de solEng (40 ng/mL o 100ng/mL) durante 24h en medio EBM2/EGM2 con antibióticos y 0% FBS. Los

sobrenadantes obtenidos fueron centrifugados para eliminar restos de posibles células apoptóticas y los niveles de BMP-4 humana se midieron con el kit comercial *Human BMP4 Quantikine ELISA Kit* (DBP400; R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para medir BMP4 en plasma de ratones transgénicos C57BL/6J que expresan constitutivamente altos niveles de *solEng* humana (*solEng+*), descritos por el grupo del Dr. López-Novoa (Universidad de Salamanca), se utilizó el kit de ELISA: *Mouse BMP4 ELISA Kit* (*Sandwich ELISA LSF13543, LSBio*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del kit permite la detección de niveles de BMP4 de ratón dentro del rango 15,6-1000 pg/mL. Los experimentos con estos ratones transgénicos se realizaron en colaboración con el Dr. Miguel Pericacho y Luis Gamella-Pozuelo del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (Universidad de Salamanca).

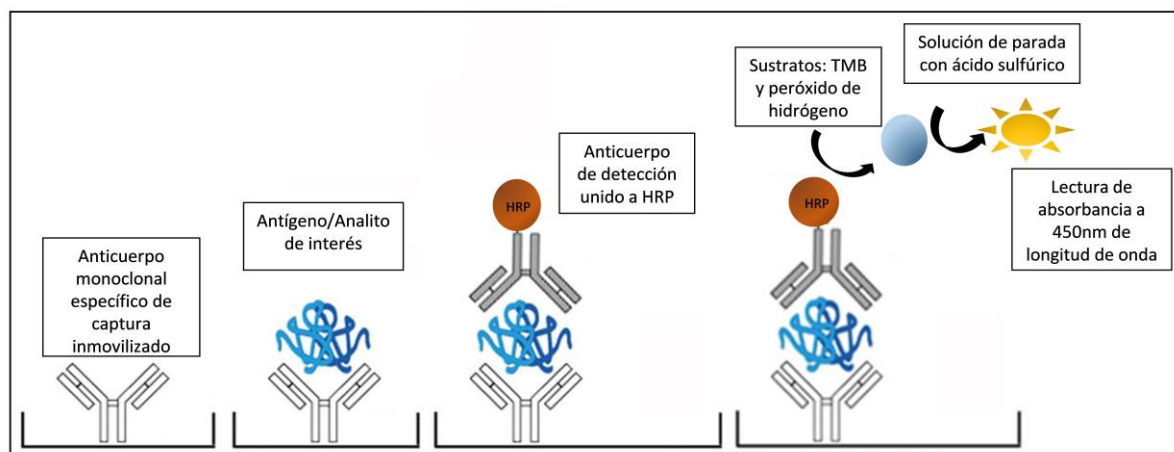


Figura 18. Esquema general del sistema de inmunodetección de proteínas mediante ELISA.

## 5. Detección de proteínas celulares mediante inmunofluorescencia.

Con el fin de analizar la co-localización de MMP14 y endogлина en la membrana durante el proceso de cierre de herida, las células HUVECs se sembraron a confluencia sobre cubreobjetos circulares de 12mm de diámetro previamente pre-incubados con 0,2% gelatina en PBS y colocados en placas de 24 pocillos. En algunos casos, las HUVECs se nucleofectaron 48 horas antes de hacer la herida, con plásmidos que sobreexpresaban KLF6 o con RNAs pequeños de interferencia (*siRNA-KLF6*) que inhibían la expresión de KLF6. A la monocapa de células endoteliales se le hizo una herida con una punta de pipeta.

A las 4-6 horas tras la herida, las células fueron fijadas con 3% de paraformaldehído en PBS y bloqueadas con PBS-1% BSA antes de la incubación con el anticuerpo primario de ratón anti-endoglinina humana (P4A4; Developmental Studies Hybridoma Bank, DHSB, Iowa University). Después, tras lavarse con PBS, las muestras se incubaron con un segundo anticuerpo primario, el monoclonal de conejo anti-MMP14 humano (ab51074; Abcam). Cuando finalizó esta segunda incubación, las células se incubaron con dos anticuerpos secundarios diferentes: i) Alexa 488 de cabra, anti-IgG de ratón; y/o ii) Alexa 647 de cabra anti-IgG de conejo (Molecular Probes, Invitrogen). Las muestras se montaron con el reactivo Prolong-DAPI (Molecular Probes, Invitrogen), que permite la tinción de los núcleos celulares, y se observaron usando un microscopio láser de fluorescencia Confocal Sp5 (DMI6000 CS; Leica Microsystems). Para la semi-cuantificación de la intensidad de fluorescencia confocal y los estudios de colocalización de endoglinina y MMP14, se realizó un análisis de los gráficos (citofluorogramas) donde se observa colocalización en los cortes centrales de cada experimento y condición de fluorescencia. Los resultados sobre la distribución de señales de fluorescencia y la superposición de píxeles se obtuvieron teniendo en cuenta la correlación de Pearson y estableciendo un fondo común y un límite para los canales del rojo y del verde. Todas estas medidas se obtuvieron usando los programas informáticos *ImageJ* y *LAS-AF 2.6*.

## 6. Detección de proteínas celulares mediante citometría de flujo.

Según el tipo de experimento, las HUVECs se despegaron con tripsina/EDTA de las placas de cultivo en condiciones basales, tras 48 horas de nucleofección, o a diferentes tiempos tras la herida (0, 2, 4, 6, 8h). Con la finalidad de medir los niveles de expresión de MMP14 y endoglinina en la superficie de la membrana celular, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-endoglinina humana (CD105; P4A4) o con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-MMP14 humana (ab51074; Abcam). Como control negativo se utilizó el marcaje con un isotipo irrelevante, el anticuerpo monoclonal de ratón X63 (IgG1). Tras lavar las células para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido a proteína, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios de cabra Alexa 488 anti-IgG de ratón (11001; Molecular Probes, Invitrogen) y Alexa 647 anti-IgG de conejo (11008; Molecular Probes, Invitrogen), respectivamente. Para marcar endoglinina y MMP14 de

HUVECs previamente nucleofectadas, los niveles de expresión de estas proteínas se midieron utilizando anticuerpos primarios conjugados: i) Alexa Fluor 488 anti-MMP14 humana (#128527; R&D Systems); y ii) APC anti-endoglin/CD105 (#166707; R&D Systems). La intensidad de fluorescencia se midió con los citómetros de flujo EPICS XL y FC500 (Beckman Coulter) utilizando un láser de argón para la excitación y detectores sintonizados a la longitud de onda determinada para la emisión de cada fluorocromo. La intensidad de fluorescencia se representa mediante el índice de expresión (porcentaje de células positivas multiplicado por la intensidad media de fluorescencia de la población total de células) respecto a la situación basal de cada experimento, a la que se le asignó el valor 1. Un mínimo de  $5 \times 10^3$  células por duplicado fueron contadas por cada punto experimental.

## 7. Análisis *in silico* de la secuencia del promotor del gen *MMP14*.

Para analizar *in silico* la secuencia del promotor del gen *MMP14* se utilizó el programa informático *MatInspector* de Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) (Cartharius y col., 2005). Con esta herramienta se pueden predecir como primera aproximación, de forma teórica, sitios potenciales de unión de factores de transcripción del promotor con elevada fiabilidad, ya que los compara con grandes matrices informáticas generadas con distintos sitios funcionales de grupos de genes regulados por los mismos factores de transcripción, y optimiza los umbrales de similitud para eliminar falsos positivos. De esta manera se realizó un análisis a nivel informático de los sitios ricos en GC que equivalen a motivos putativos o probables de unión de los factores KLF6 y Sp1 a la región proximal del promotor de los genes *MMP14 humano* (ID: 4323; posiciones -1544 al +247) y *Mmp14* de ratón (ID:17387), correspondientes a secuencias 5' respecto al marco de lectura de la proteína (*upstream* o "corriente arriba" del *ORF* o marco abierto de lectura).



## 8. Medida de la actividad de metaloproteinasas mediante un sustrato fluorogénico.

La actividad de las metaloproteinasas, se determinó usando el péptido fluorogénico Mca-PLGL-Dpa-AR-NH<sub>2</sub> (ES001; R&D Systems) que sirve como sustrato. Se trata de un péptido con un fluoróforo apantallado (*quenched*) que sólo emite fluorescencia tras ser cortado por las peptidasas o metaloproteasas. Después de realizar la herida, las monocapas de HUVECs a diferentes tiempos se lavaron y se incubaron con 3 µM del péptido fluorogénico diluido en dimetil sulfoxido (DMSO) y tampón TNC (50mM Tris, 0,15M NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub> y 0,002% NaN<sub>3</sub>; pH-7,5) durante 1 hora a 37°C. La reacción se paró añadiendo "solución de parada 10X" (100nM EDTA y 0,02% NaN<sub>3</sub>). Las muestras se transfirieron a una placa de fondo negro de 96 pocillos y la señal de fluorescencia se midió utilizando una longitud de onda de excitación a 320 nm y de emisión a 405 nm, con el Lector *Varioskan Multimode Microplate Reader* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 9. Modelo de lesión mecánica del endotelio *in vivo* en ratones *klf6*<sup>+/-</sup> y WT (*klf6*<sup>+/+</sup>).

La generación de los ratones *Klf6*<sup>+/-</sup> en la cepa C57BL/6 se ha descrito anteriormente por el grupo de Matsumoto y col. (2005) y los animales utilizados en estos experimentos fueron facilitados por los Drs. Scott L. Friedman (*Division of Liver Diseases*, Hospital de Mount Sinai, Nueva York, EEUU) y Toru Suzuki (*Department of Cardiovascular Sciences*, Universidad de Leicester, Leicester, Reino Unido). Los experimentos del daño endotelial de las arterias se realizaron en el laboratorio de la Dra. Mercè Roqué Moreno (*Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques*, Barcelona, España). Tanto los ratones *Klf6*<sup>+/+</sup> (WT, *Wild Type*) como los *Klf6*<sup>+/-</sup> de la cepa C57BL/6, de unas 13 semanas de edad, se anestesiaron con isoflurano y se les realizó un daño endoluminal bilateral en la arteria femoral mediante la utilización de un alambre-guía de angioplastia de 0,25 mm de diámetro, descrito anteriormente por Roque y col. (2000). A los 28 días, después de realizar el daño mecánico, los animales fueron sacrificados y perfundidos *in situ* con PBS, seguido de PFA al 4% en PBS con ayuda de una bomba peristáltica. Tras aislar, fijar, descalcificar y lavar los miembros traseros, se cortaron segmentos transversos de 2 mm de

grosor a nivel de la herida y se embebieron en bloques de parafina (Garrido-Martín y col., 2013). Secciones de 5µm de espesor se cortaron con el microtomo y se obtuvieron así cortes de fragmentos dañados y no dañados de arterias femorales para el posterior análisis inmunohistoquímico de la proteína de membrana MMP14.

## 10. Detección de proteínas en tejido mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Para analizar el patrón de expresión proteica de MMP14 en la lesión vascular, se ha seguido una técnica similar a la descrita por Garrido-Martín y col. (2013). Las secciones de las arterias femorales embebidas en parafina se desparafinaron mediante precalentamiento en una estufa a 60°C durante 1 hora y posterior inmersión en xilol durante 10 minutos. Para seguir con la hidratación de los cortes, se utilizaron una serie de alcoholes con graduación decreciente, donde la muestra se sumergía en cada uno de ellos durante 5 minutos a temperatura ambiente: 1) 100% etanol; 2) 96% etanol; 3) 70% etanol; y 4) 50% etanol. A continuación, las muestras se mantuvieron en PBS (pH -7,6) durante 10 minutos. Para el desenmascaramiento de antígenos, las muestras fueron tratadas con una solución 0,01M citrato sódico, pH -6, durante 45 minutos a 95°C al baño maría y tras dejar enfriar todas las muestras, se marcaron los límites de las secciones con un rotulador hidrofóbico (*Dako pen*, Dako-Agilent Technologies). Después se bloquearon la actividad endógena peroxidasa de los tejidos y los epítomos inespecíficos con “reactivo bloqueante de peroxidasa” y “reactivo bloqueante de proteínas” (Caseína diluida al 0,4% en PBS), respectivamente. Estos reactivos son parte del kit comercial *Novolink Polymer Detection System* para inmunohistoquímica (Novocastra, Leica Biosystems). Tras estos bloqueos, las muestras se lavaron con PBS.

Para detectar la expresión de MMP14 en tejidos de ratón, las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MMP14 de ratón (ab51074; Abcam), diluido 1:100 en PBS-1% BSA, durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Como control negativo, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante del mismo isotipo IgG y a la misma concentración. Después, las muestras se bloquearon con el reactivo de bloqueo post-primario suero de cabra (especie productora del anticuerpo secundario utilizado) al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con

el anticuerpo secundario policlonal de cabra, anti-IgG (H+L) de conejo marcado con biotina (31820; Thermo Scientific) con una dilución 1:500 en PBS-1% BSA durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras dos lavados enérgicos con PBS, las muestras se incubaron con estreptavidina-HRP (21126; Pierce) a una concentración de 2 ng/ $\mu$ L en PBS-1% BSA durante media hora a temperatura ambiente. Para revelar la actividad peroxidasa de la HRP se utilizó el colorante DAB (3-3'-diaminobencidina; Dako) durante 5 minutos, a temperatura ambiente. La reacción se paró lavando con agua destilada. Los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina de Meyer al 0,02% (Sigma-Aldrich) durante 1 minuto, seguido de una inmersión instantánea en agua amoniacal que intensifica, contrasta y fija la señal. Las muestras ya teñidas, se deshidrataron de nuevo mediante la inmersión en alcoholes en orden creciente (50%, 70%, 95% y 100%) durante 5 minutos y posterior inmersión en xilol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras finalmente se montaron con medio de montaje HiMo (05-HM, Bio-Optica), para observarlas con una cámara acoplada a un microscopio de campo claro.

## 11. Análisis de expresión de RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (*qRT-PCR*).

El RNA total de las células sometidas a los distintos análisis (condiciones basales, transfecciones, tratamientos o con herida) así como el RNA extraído de tejidos previamente homogeneizados de ratones transgénicos *WT* o *solEng+*, se aisló y purificó utilizando los reactivos, bien del kit *SpeedTools* (Biotools), bien del kit *RNeasy* (Qiagen). Un  $\mu$ g de RNA total de cada muestra se retrotranscribió con el kit comercial de alta capacidad de retrotranscripción de cDNA *iScript cDNA Synthesis kit* (BioRad) en un volumen final de 20  $\mu$ L, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se utilizó como molde para la posterior PCR cuantitativa a tiempo real. Según los tipos de oligonucleótidos disponibles en el laboratorio (marcados o no con FAM) se realizó el análisis de los genes seleccionados mediante dos ensayos de *qRT-PCR* diferentes: i) Detección con el reactivo *SYBR Green* basada en el marcaje del producto de DNA de doble cadena completo amplificado y acumulado durante la PCR; o ii) Detección mediante oligonucleótidos marcados previamente con FAM (reportero fluorescente) en la región 5', lo que permite una medida más específica de la diana génica de interés, según se acumula durante la PCR. Para realizar la *qRT-PCR* con *SYBR*, se utilizó la mezcla *iQ SYBR Green Supermix* (BioRad),

que contiene una DNA polimerasa,  $Mg_2Cl$ , una mezcla de dNTPs, el tampón de reacción, el fluoróforo *SYBR-green*, 1  $\mu g$  de cDNA, los oligonucleótidos específicos del gen reverso y directo (diseñados según el programa informático *Oligo perfect designer* de Invitrogen de predicción de secuencias), y agua libre de RNasas hasta completar los 20  $\mu L$ /pocillo. La amplificación del DNA se realizó con el termociclador *LightCycler 96* de Roche. Para llevar a cabo la *qRT-PCR* con oligonucleótidos marcados con FAM, se utilizó la mezcla *FastStart Essential DNA Probes Master Mix* de Roche que contiene una mezcla parecida a la descrita para SYBR, pero con una polimerasa más específica y sensible, 1  $\mu g$  de cDNA, el oligonucleótido específico para el gen marcado con FAM (*TaqMan Gene Expression Assays*, Applied Biosystems) y agua libre de RNasas hasta completar los 20  $\mu L$ /pocillo. Estos experimentos se realizaron con el termociclador "iQ5" (Bio-Rad). Como control interno, en ambos tipos de *qRT-PCR*, se amplificó el RNA ribosómico 18S humano o murino, debido a su abundante expresión y porque no se altera por los mecanismos normales de regulación transcripcional. Además, las muestras se analizaron por triplicado, y cada ensayo se repitió al menos 3 veces, mostrándose en los resultados la media de los experimentos normalizados de acuerdo a los niveles de expresión del RNA ribosómico 18S mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La intensidad de la señal de fluorescencia se relacionó con la cantidad de producto génico existente. La especificidad de los productos de la PCR se dilucidó observando las curvas de disociación, que muestran sólo los productos amplificados. Los oligonucleótidos cebadores utilizados para la PCR en tiempo real con SYBR o con FAM se muestran en las **Tablas 1 y 2**, respectivamente.

Gen Diana	Secuencia de los cebadores (5' → 3')		Tm (°C)
	Directo (Fw)	Reverso (Rv)	
<b>hENG</b>	GCCCCGAGAGGTGCTTCT	AGGAAGACACTGCTGTTTAC	66.9/65.4
<b>hKLF6</b>	CGGACGCACACAGGAGAAAA	CGGTGTGCTTTCGGAAGTG	68.5/66.8
<b>hIL6</b>	GAAGGCAGCAGGCAACAC	CAGGAGCCCAGCTATGAACT	66.8/68.5
<b>hMMP14</b>	CGATGTGGTGTTCAGACAA	TGGATGCAGAAAGTGATTTT	64.8/60.3
<b>h/m18S</b>	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG	64.5/64.6
<b>hALK1</b>	ATCTGAGCAGGGCGACAGC	ACTCCCTGTGGTGCAGTCA	68/64.7
<b>hALK5</b>	CATTAGATCGCCCTTTTATTTT	CACAATAGTTCTCGCAATTGTT	60.3/60.6
<b>hID1</b>	GCTGCTCTACGACATGAACG	CTCCAAGTGAAGGTCCCTGA	63.6/64.3
<b>hPAI-1</b>	CACCCTCAGCATGTTTCATTG	GGTCATGTTGCCTTTCCAGT	64.2/63.9
<b>mBMP4</b>	CGTTACCTCAAGGGAGTGGA	ATGCTTGGGACTACGTTTGG	64/63.8

**Tabla 1 (Página anterior). Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la amplificación por PCR cuantitativa.**

Se muestran las parejas de secuencias de oligonucleótidos (cebadores) utilizados para la amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los genes especificados. Las secuencias complementarias a la hebra (+) en sentido directo (*Fw*, *Forward*) y las secuencias complementarias a la hebra (-) en sentido inverso (*RV*, *Reverse*) están indicadas. Los nombres de los oligonucleótidos señalados con una “h” reconocen las secuencias génicas humanas y los señalados con una “m” las secuencias murinas.

Gen Diana	UniGene ID	Assay ID
<b>BMP4</b>	652 (Hs.68879)	Hs03676628_s1
<b>NFκB</b>	4790 (Hs.618430)	Hs00765730_m1
<b>Smad1</b>	4086 (Hs.604588)	Hs01077084_m1
<b>Smad5</b>	4090 (Hs.167700)	Hs00195437_m1
<b>Smad2</b>	4087 (Hs.12253)	Hs00183425_m1
<b>STAT3</b>	6774 (Hs.463059)	Hs01047580_m1

**Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos humanos marcados con FAM utilizados en la amplificación por PCR cuantitativa.**

Se muestran los códigos de identificación que pertenecen al gen humano correspondiente, tanto en la base de datos *UniGen*, como en la casa comercial *Applied Biosystems* (*Assay ID*).

## 12. Inmunoprecipitación de proteínas (IP).

La co-inmunoprecipitación de las proteínas endoglina y MMP14 se realizó en células *HUVECs* control (0h) y después de 6h tras realizar la herida *in vitro*, nucleofectadas o no 48 horas antes. Las células fueron lisadas e incubadas a 4°C durante 30 minutos con solución de lisis celular (1% NP40; 150mM NaCl; 50mM Tris; 0,5mM NaF; 1mM PMSF; e inhibidores de proteasas y fosfatasa). Los extractos celulares obtenidos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, para sedimentar posibles restos celulares. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas totales mediante el ensayo de proteínas con ácido bicinónico (*BCA Protein Assay*, Thermo Scientific) respecto a un estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro o lector de placas *Varioskan* a una longitud de onda de 562 nm. Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo a 4°C con proteína G, unida covalentemente a bolas magnéticas (*Magnetic beads*, Millipore). Cantidades equivalentes de los lisados de proteínas de alrededor de 300 ng se pre-aclararon mediante la incubación con Proteína G-bolas magnéticas durante 1h a 4°C (para evitar interacciones inespecíficas de unión de la muestra con la Proteína G). Tras este proceso, se recogió la muestra y el sobrenadante fue

sometido a inmunoprecipitación. Para ello, el complejo formado por anticuerpo anti-MMP14 en dilución 1:80 (ab51074; Abcam) acoplado a Proteína G-bolas magnéticas, se incubó con los extractos celulares durante toda la noche en agitación lenta a 4°C. Además, en paralelo, se incluyó un control negativo donde se incubó el extracto celular con un complejo formado por Proteína G-bola magnética más el anticuerpo del mismo isotipo IgG. Finalmente, estos inmunoprecipitados fueron lavados con solución TNE-T (50mM Tris-HCl a pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA y 0,01% Tween-20) y eluidos con tampón de elución en condiciones reductoras (TNE-T + tampón Laemmli + 100mM DTT) para su posterior análisis por electroforesis.

### 13. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (*Western Blot*).

Las proteínas se separaron y analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Muestras de extractos celulares totales o inmunoprecipitados (método previamente descrito) diluidos en tampón Laemmli (4% SDS, 20 glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125 M Tris HCl. pH 6.8) con DTT (condiciones reductoras [CR]) se hirvieron durante 5 minutos a 95°C antes de ser cargados en el gel. Las proteínas se separaron por pesos moleculares con geles de poliacrilamida al 8%, bajo condiciones reductoras, adaptados al sistema *Mini Protean III* (Bio-Rad). Después fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) mediante el sistema de electrotransferencia en seco *iBlot Dry Blotting System* (Invitrogen). Para evitar reconocimientos inespecíficos del anticuerpo, las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave con leche desnatada al 5% en TBS-Tween 0,05%. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario monoclonal P4A4 de ratón anti-endoglina humana durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Después de lavar las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBS-T, se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) (Dako Diagnostics) durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave y se volvieron a lavar en TBS-T. Las bandas reconocidas por los anticuerpos se detectaron mediante una reacción de quimioluminiscencia, añadiendo el sustrato de la peroxidasa y utilizando el producto comercial *Supersignal West Pico-Chemiluminiscent*

(Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas o densitometrado se realizó con ayuda del programa informático *Quantity One* (Bio-Rad).

## 14. Inmunoprecipitación de cromatina (*CHIP*).

Las células HUVECs se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro hasta confluencia. En algunas de las placas se realizaron múltiples heridas, de tal manera que había dos condiciones diferentes: células control y células sometidas a daño a las 3 horas de realizar la herida. Ambas condiciones celulares se fijaron con formaldehído al 1% en medio de cultivo DMEM (Gibco) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la inmunoprecipitación de cromatina se utilizó la batería comercial de reactivos del producto comercial *ChIP-IT Express Enzymatic Kit* (53009; Active Motif). La reacción de fijación se paró con una solución comercial de glicina, y las células se rasparon en presencia del inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), lisándose después con el tampón de lisis comercial del kit. Los núcleos fueron separados y liberados mediante la rotura mecánica de las células en hielo, usando un homogeneizador de cristal. Posteriormente, los núcleos fueron digeridos con un combinado enzimático durante 10 minutos a 37°C para obtener fragmentos de DNA genómico de aproximadamente 200pb. Una alícuota de esta cromatina digerida se guardó para usarse como control de carga (*input*; lisado nuclear total o cromatina no inmunoprecipitada). El resto de la cromatina digerida se incubó con bolas magnéticas unidas a proteína G y a 10 µg de i) anticuerpo policlonal de conejo anti-KLF6 humano (R-173; sc-7158, Santa Cruz Biotechnology), ii) anticuerpo policlonal de conejo anti-histona H3K4me2 (39141; Active Motif) como control positivo, o iii) IgG control de conejo (sc-2027; Santa Cruz Biotechnology) como control negativo. Estos inmunocomplejos se formaron durante toda la noche, manteniendo su incubación en un agitador orbital a 4°C. Tras ese periodo, las bolas magnéticas de proteína G unidas a estos complejos inmunes se precipitaron, se lavaron y se eluyeron con la solución tampón proporcionada por el fabricante. A continuación el entrecruzamiento (*cross-linking*) creado por el formaldehído entre las proteínas nucleares y la cromatina se revirtió mediante calentamiento a 95°C y posterior tratamiento con 100 mM NaCl y proteinasa K durante 1h a 37°C. La actividad de la proteinasa K se paró con una solución específica del fabricante y las muestras se centrifugaron y precipitaron. Los sobrenadantes

resultantes se utilizaron para la detección de los fragmentos de DNA inmunoprecipitados mediante amplificación por PCR usando 4 parejas de oligonucleótidos o cebadores específicos para amplificar cuatro regiones ricas en sitios probables de unión de KLF6 al promotor de MMP14. Los cebadores empleados se seleccionaron de modo que mapearan cuatro regiones del promotor de MMP14 ricas en sitios de unión para KLF6, según el análisis *in silico* realizado anteriormente. Las secuencias de los cebadores y regiones que limitan dentro del promotor del gen de MMP14, están detallados en la **Tabla 3**. Para los controles positivos y negativos de PCR se utilizaron las parejas de oligonucleótidos del kit *ChIP-IT control human* (53010; Active Motif).

Nombre (región génica)	Secuencia (5' → 3')		Tamaño fragmento génico amplificado
	Directo (Fw)	Reverso (Rv)	
Prom MT1 ChIP 1 (-1142/-857)	AGACTTCTATTCTTCTGCCA	ATAAAGCTGACCGTGAGA	285 pb
Prom MT1 ChIP 2 (-783/-569)	CTTAAGAATTGCCTCCTTT	CCAACCTTTGTAGAAAGAC A	214 pb
Prom MT1 ChIP 3 (-107/+72)	GGCTAAAACAACCACGTC	GTGCCTGTTTGCTCTTCT	179 pb
Prom MT1 ChIP 4 (-7/+233)	AGGGAACCAGACCCAGTTCG	TCCGAGACCACCGGGTCA	240 pb

**Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR posterior a la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).**

Las abreviaturas empleadas son: *Fw* (*Forward*), cebador complementario a la hebra (+) en sentido directo; *Rv* (*Reverse*), cebador complementario a la hebra (-), en sentido reverso. Además se muestra el tamaño de cada fragmento génico amplificado en pares de bases (pb).

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa de baja temperatura de fusión o “*low melting*” al 3%, diluido en TAE (Tris, Acetato y EDTA). Los geles se revelaron, tras la incubación con la solución diluida de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific), con el sistema Gel Doc XR System (Bio-Rad) y las bandas se cuantificaron con ayuda del programa informático *Quantiy One* (Bio-Rad).

## 15. Vectores de expresión y ensayos de transfección o nucleofección y de actividad reportera.

Todos estos ensayos se llevaron a cabo mediante transfección transitoria de las células HEK293T o HMEC-1 o nucleofección de HUVECs, empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y el kit “*Amaya HUVEC nucleofector Kit*” (VPB-Lonza), siguiendo las



instrucciones de los fabricantes. Las células HEK293T y HMEC-1 se contaron y distribuyeron a una densidad de  $8 \times 10^4$  células/pocillo (en placas de 24 pocillos), el día anterior a la transfección. Para la transfección con Lipofectamina 2000, los plásmidos se incubaron previamente en medio Opti-MEM (Gibco) sin FBS ni antibióticos junto con la Lipofectamina durante 20 minutos a temperatura ambiente. La suspensión de estos complejos formados, se añadió sobre las células sembradas, dejándolas en el incubador a  $37^\circ\text{C}$  como mínimo durante 4 horas, para que las células pudiesen captar los complejos. A las 4-6 horas de la transfección, los cultivos se lavaron con PBS y se reemplazó el medio por medio completo DMEM con 10% FBS y antibióticos incubándolas a  $37^\circ\text{C}$ . Para los ensayos de nucleofección,  $10^6$  HUVECs por cada condición se juntaron con la mezcla de soluciones del kit específico más los plásmidos de interés y se nucleofectaron mediante shock eléctrico con el sistema *Nucleofector Device* (Lonza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta suspensión celular se sembró en placas de 6 pocillos añadiendo a la mezcla medio completo EBM2/EGM2 con 10% FBS e incubando las células a  $37^\circ\text{C}$ . Después de 48 horas de incubación, tanto las células transfectadas como las nucleofectadas, se recogieron y lisaron y se analizó su actividad luciferasa, la expresión de la proteína concreta por inmunodetección o citometría de flujo o bien la expresión del RNA mensajero mediante RT-PCR cuantitativa, según el caso. El factor de transcripción KLF6 humano se sobreexpresó o silenció con la ayuda de los vectores pCiNeo/KLF6 (Ratzliff y col., 1998) o pSuper-KLF6 (Li y col., 2005) respectivamente. Para algunas co-transfecciones también se utilizaron la forma *WT-KLF6*, de 283 aminoácidos y que contiene su dominio de unión y tres dedos de zinc, y las dos isoformas de *Splicing* alternativo de KLF6: *Sv1* (con 195 aa y sin los tres dedos de zinc) y *Sv2* (con 241 aa y sin dos dedos de zinc). El vector que sobreexpresa la proteína verde fluorescente GFP (*pMax-GFP vector*, Amara Biosystems) se utilizó como control interno para comprobar la eficiencia de la transfección de forma visual. Para los ensayos reporteros de MMP14-luciferasa se construyeron 3 diferentes vectores 5' (-1544/235; -800/235; y -300/235) del promotor de MMP14 (pMT1) que se sintetizaron químicamente (BioNova Científica SL) y se clonaron en un plásmido básico pGL2-luciferasa (Promega) que codifica la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*. Además sobre el promotor más pequeño se pudo realizar una mutagénesis dirigida en uno de los sitios probables de unión a KLF6.

Tanto las células HEK293T como las HMEC-1 y las HUVECs se co-transfectaron, cuando el experimento lo requiera, con 1  $\mu\text{g}$ /pocillo de pGL2-luciferase basic, pGL2-luc-pMT1-1544,

pGL2-luc-pMT1-800 o pGL2-luc-pMT1-300 más los vectores de expresión Mock, pCIneo-KLF6 o pSuper-KLF6 para cada condición. Después de 48 horas de la transfección, los lisados celulares se analizaron usando el ensayo dual de sistema reportero de luciferasa (Promega) en el luminómetro *Glomax Detection System* (Promega). En los casos en los que se realizaron tratamientos con solEng (40, 100 o 500 ng/mL) o experimentos de cierre de herida, las células HEK293T, HMEC-1 y/o HUVECs fueron transfectadas o nucleofectadas (según el caso) con los vectores reporteros pKBF-luc/NFκB (Yano y col., 1987) o pGL3-IL6-Luc (Cedido por el Dr. Manuel Fresno, CBM-UAM-CSIC, Madrid), además de 50ng del vector pCMV-βgal para poder normalizar los resultados. En los experimentos con el vector pKBF, como control positivo de la transfección, fue necesario tratar las células durante 24h con TNFα 5ng/mL. La eficiencia de transfección se normalizó midiendo la actividad β-galactosidasa insensible a cualquiera de nuestros tratamientos, normalizando así el resultado según el número de células transfectadas. La mayoría de los resultados se normalizaron representando las actividades respecto a la actividad basal, a la que se otorgó arbitrariamente el valor 1 o 100%, según el caso. Se definen como Unidades Relativas de Luciferasa (URL) el cociente entre la actividad luciferasa de nuestro vector reportero específico y la actividad del vector con β-galactosidasa. Todos los puntos de las transfecciones se hicieron por triplicado y cada experimento se repitió al menos 3 veces, para hacer las medias. Todos los vectores de expresión y los vectores reporteros (acoplados a un cDNA que codifica para la luciferasa) empleados en esta tesis se muestran en la **Tabla 4**.

Nombre vector o reportero	Procedencia o Referencia	Descripción (Tipo)
pCIneo-∅	Promega	Vectores de expresión dirigida por el promotor fuerte de citomegalovirus (CMV, expresión en células de mamífero)
pCIneo-KLF6	(Ratzu y col.,1998; Botella y col.,2002)	
pSuper-∅	OligoEngine, Seattle, WA, EEUU	Vector de expresión de RNA interferente corto dirigido por el promotor de la polimerasa III. Disminuye la expresión del gen sintetizándose el siRNA específico.
pSuper-KLF6	(Li y col., 2005, Brummelkamp y col.,2002)	
WT-KLF6 (pcDNA3.1-FL-KLF6)	(Botella y col., 2009)	Vector de expresión con KLF6 “salvaje” que contiene 3 dedos de zinc y dominio de unión
SV1-KLF6 (pcDNA3.1-FL-KLF6)	(Botella y col., 2009)	Vector de expresión con la variante de <i>Splicing</i> 1 de KLF6 sin los 3 dedos de zinc

<b>SV2-KLF6 (pcDNA3.1-FL-KLF6)</b>	(Botella y col., 2009)	Vector de expresión con la variante de <i>Splicing 2</i> de KLF6 sin 2 dedos de zinc
<b>pDisplay</b>	Invitrogen	Vector de expresión dirigido por el promotor T7
<b>pDisplay-Eng FL</b>		Vector de expresión con ENG FL (Forma larga de endoglina)
<b>pCMV-βGal</b>	Invitrogen	Vector reportero de actividad β-galactosidasa acoplado a un promotor constitutivo de citomegalovirus. Se usa para medir eficiencia de transfección
<b>pGL2-basic-luc</b>	Promega	Reportero de luciferasa
<b>pGL2 (-1544/ +247) pMT1</b>	BioNova	Vector pGL2-basic-luc con un fragmento del promotor MMP14 que dirige la expresión de la luciferasa
<b>pGL2 (-800/ +247) pMT1</b>	BioNova	
<b>pGL2 (-300/ +247) pMT1</b>	BioNova	
<b>pGL2 (-300/ +247) pMT1 mt +89</b>		Vector pGL2-basic-luc con un fragmento del promotor MMP14 mutado 89(C<T), que dirige la expresión de la luciferasa
<b>pKBF-luc/NFκB</b>	(Botella y col., 2000, Yano y col., 1987)	3 elementos de respuesta a NFκB en tándem
<b>pGL3/pIL-6</b>	Dr. Manuel Fresno (CBM-UAM-CSIC, Madrid)	Vector pGL3 -luc con un fragmento del promotor IL-6 que dirige la expresión de la luciferasa
<b>pGL3-basic-∅</b>	Promega	Reportero de luciferasa
<b>pMax-GFP-vector</b>	Amara Biosystems	Reportero de GFP

**Tabla 4: Vectores de expresión y vectores reporteros empleados para los ensayos de transfección y nucleofección.**

Se muestra el nombre del vector empleado y su reportero si lo tiene, una pequeña descripción y su procedencia. Abreviaturas utilizadas: ∅ (vector vacío).

## 16. Ensayos de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia pequeño.

El silenciamiento de la expresión génica de KLF6 o de MMP14 en HUVECs se realizó mediante nucleofección y usando una mezcla de 3 siRNA diferentes cuya diana es *KLF6* humano (sc-38021; Santa Cruz Biotechnology) o *MMP14* humana (NM\_004995; *Mission esiRNA*, Sigma). Como control negativo para cada tipo de experimento, se utilizó "Scrambled siRNA" (*Universal negative control SIC001*; Sigma). Como control interno para comprobar la eficiencia de la nucleofección mediante fluorescencia bajo el microscopio se utilizó un siRNA específico de GAPDH (*siRNA silencer FAM GAPDH*, AM4650; Ambion), además de un vector que sobreexpresa la proteína verde fluorescente GFP (*pMax-GFP vector-Amara Biosystems*). Cuando el experimento lo requería, 24h más tarde de la

nucleofección, las HUVECs se co-transfectaban con algunos de los vectores de expresión descritos en el apartado anterior. A las 48 horas después de la nucleofección, se midió la expresión de MMP14 o endoglina, su co-localización, porcentaje de cierre de herida o niveles de endoglina soluble secretada al medio, según el experimento que se llevase a cabo.

## 17. “Plataformas” de análisis de proteínas (Arrays proteicos).

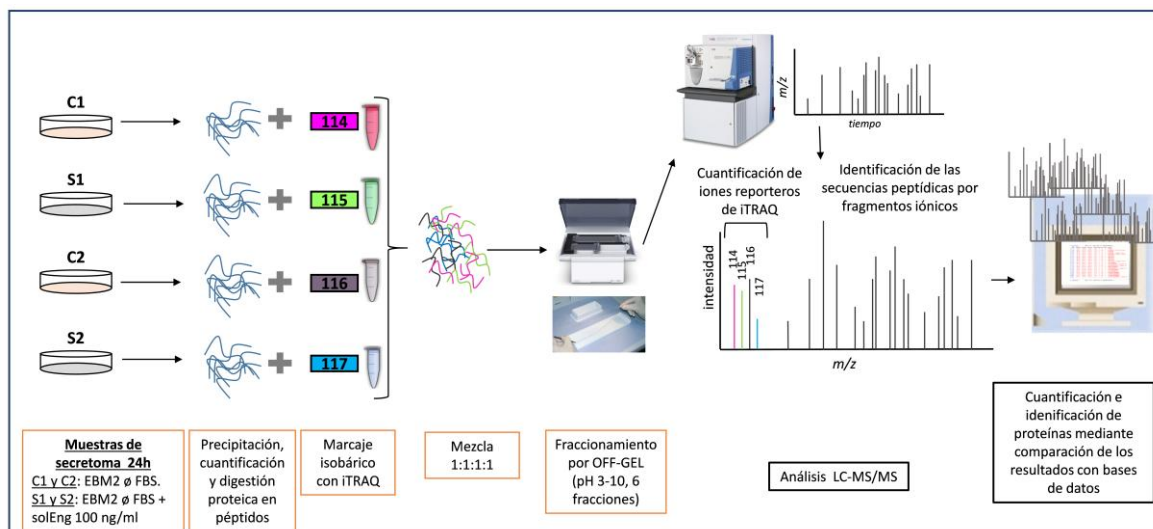
Con los *arrays* de proteínas angiogénicas que contienen diferentes anticuerpos inmovilizados a la membrana, se ha realizado de una manera rápida y masiva el análisis de más de 50 proteínas. Para este ensayo se utilizaron los sobrenadantes condicionados libres de suero tratados o no con solEng de células HUVECs, del cultivo primario de células endoteliales de pulmón de ratón (*MLEC1*) y de la línea celular inducible endotelial de pulmón de ratón (*MLEC2*), descritas más abajo. En el caso de los arrays realizados con los sobrenadantes de la línea celular *MLEC2* se compararon cuatro condiciones diferentes: células iKO-Eng control (c-*MLEC2*) y células iKO-Eng KO (KO-*MLEC2*), ambas tratadas o no con 100ng/mL de solEng durante 24h. La cantidad de proteínas angiogénicas secretadas al medio se analizaron en los sobrenadantes utilizando los kits *Human Angiogenesis Array* y *Mouse Angiogenesis Array* (*Proteome Profiler Array*; ARY007 y ARY015, respectivamente; R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos *arrays* contienen impresos anticuerpos específicos para reconocer, bien 55 o bien 53 proteínas angiogénicas distintas de humano o de ratón, respectivamente. Las membranas se revelaron con una película fotográfica y se escanearon para posteriormente cuantificarse con el programa informático de análisis *Quantity One* (Bio-Rad). Las intensidades relativas de los puntos se normalizaron restando el fondo de las membranas y teniendo en cuenta la concentración de proteínas total de cada sobrenadante medidas por el método BCA. Los resultados finales son comparados 2 a 2 según las condiciones que interese para resaltar aquellas proteínas diferencialmente expresadas, siendo estos ensayos una primera aproximación para experimentos posteriores de validación.

## 18. Cuantificación proteica con marcaje isobárico (*iTRAQ*) y posterior análisis LC-MS/MS.

Esta técnica se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Ignacio Casal (con ayuda de la Dra. Irene García-Palmero y de Beatriz Escudero) y el servicio de proteómica de nuestro centro (CIB-CSIC). Con esta técnica de proteómica cuantitativa basada en la espectrometría de masas (MS) se pueden obtener resultados en cuanto a cambios dinámicos de la expresión de proteínas, gracias a la comparación de dos o más proteomas, usando marcajes isotópicos estables, lo que da lugar a una diferencia de masa en los espectros MS/MS de cada uno de los péptidos analizados (Casado-Vela y col., 2010). El marcaje isobárico se realiza *in vitro* y se fundamenta en la incorporación de reporteros químicos marcados isotópicamente que se unen de forma covalente, mediante una reacción química, a los péptidos. Con esta estrategia de marcaje *iTRAQ* (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) se permite la cuantificación relativa de 2 a 8 proteomas en el mismo experimento. En esta tesis se analizaron 4 proteomas (dos condiciones distintas por duplicado) utilizando para el marcaje con *iTRAQ* el kit *iTRAQ reagent 4-Plex* (AB SCIEX), siguiendo las instrucciones del fabricante. El método de tratamiento, marcaje, análisis y cuantificación de las posibles diferencias de expresión proteica, se detalla a continuación. Las células HUVECs se cultivaron en medio completo (EBM2/EGM2 con 10% FBS y antibióticos) hasta alcanzar el 80% de confluencia. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante toda la noche en medio EBM2 con 1% FBS, con el fin de disminuir la cantidad de suero y pre-acondicionar la células. Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS para eliminar posibles restos de suero y albúmina y así evitar interferencias en el análisis posterior de péptidos. A continuación, las células se incubaron durante 24 horas más en medio EBM2 sin suero en presencia o no de 100 ng/mL solEng. Tras este tiempo de tratamiento, se recogió el medio y las proteínas se precipitaron con acetona durante toda la noche a -20°C. La concentración de proteína se cuantificó en cada condición: HUVECs control sin tratar (muestras C1 y C2); y HUVECs tratadas con solEng (muestras S1 y S2), utilizando finalmente 50µg por condición. La muestra se centrifugó a la máxima velocidad 20 minutos a 4°C para concentrar el pellet proteico y se digirió con tripsina a 37°C durante toda la noche en agitación suave. Los péptidos resultantes de las cuatro muestras (C1, S1, C2 y S2) se marcaron covalentemente de manera individual con los 4 reactivos isobáricos del kit comercial (#114, #115, #116 y

#117, respectivamente) (**Figura 19**). El contenido de los 4 tubos de reacción se juntó, desaló y purificó mediante una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna *Resource S* (*GE Healthcare*), con el fin de eliminar posibles sustancias o impurezas de la mezcla que pudieran interferir con los pasos posteriores. La muestra resultante se secó al vacío usando el concentrador SpeedVac, a 30°C durante aproximadamente 1 hora. A continuación, los péptidos trípticos se resuspendieron en una solución que contiene concentraciones específicas de anfólitos (5% glicerol, 1% anfolina y agua), y se fraccionaron en base a su punto isoeléctrico mediante OFFGEL (*Agilent Technologies*), utilizando tiras de isoelectroenfoque de 6 pocillos (*13 cm Immobiline Dry Strip, pH 3-10; GE Healthcare*). El fraccionamiento de la muestra permite aumentar la resolución y sensibilidad en la identificación y cuantificación de proteínas poco abundantes. Las fracciones recuperadas del OFF-GEL se desalaron mediante columnas OMIXs que contienen una resina de fase reversa C18 (*Millipore*) con el fin de eliminar impurezas de la muestra, y se secaron al vacío en el SpeedVac. Posteriormente las muestras fueron reconstituidas en 5 µl de 0,1% ácido fórmico y 2% acetonitrilo (ACN) para su posterior análisis por espectrometría de masas. Para la identificación y cuantificación de proteínas, las fracciones de péptidos trípticos se analizaron por LC-MS/MS (Cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem) en el espectrómetro de masas de trampa iónica LTQ-Orbitrap Velos (*Thermo Scientific*). La intensidad relativa de los péptidos identificados en el análisis MS se equiparó a la proporción exacta de cada proteína presente en las muestras originales. Todos los resultados que se obtuvieron del espectrómetro de masas (picos MS/MS de cada péptido marcado específicamente, lo que ayuda a relativizar su expresión) se analizaron, cuantificaron e identificaron mediante la comparación con bases de datos estandarizadas de humanas usando el motor de búsqueda de Mascot (version 2.3, *Matrix Science*) y con el programa informático *Proteome Discoverer* (versión 1.3.0.339; *Thermo Scientific*), *software* que calcula las diferencias de expresión entre condiciones, de una misma proteína identificada, mediante una serie de ratios que se utilizaron para determinar alteraciones en la abundancia. Todos los datos obtenidos fueron enfrentados con la base de datos de Uniprot ([uniprot.org](http://uniprot.org)) La mayoría de las proteínas relacionadas con el ribosoma o proteosoma, por considerarse habituales contaminantes, se descartaron para la selección de los resultados finales. Además se pudo realizar un estudio estadístico mediante T-test para la determinación de las proteínas significativamente desreguladas. Se identificaron como significativas aquellas proteínas cuyo p-valor, bastante restrictivo, era  $\leq$

0,005 y cuya expresión se incrementaba en  $\geq 1,5$  o se reducía en  $\leq 0,67$ , comparando los secretomas de HUVECs tratadas frente a las muestras control.



**Figura 19.** Esquema general del método seguido para el marcaje isobárico del secretoma de las células HUVECs tratadas o no con solEng durante 24h.

Se muestra de forma esquemática las 4 muestras diferentes, duplicados de las dos condiciones (C1, C2, S1, S2). Se indica el marcaje con 4 isótopos isobáricos distintos, el posterior fraccionamiento y purificación, y el análisis de péptidos por LC-MS/MS con el posterior procesamiento de datos y resultados.

## 19. Línea celular inducible-KO endotelial de pulmón (*MLEC2 Eng<sup>FL/FL</sup>; ROSA-CRE<sup>ERT</sup>; Immortal*).

Esta línea de células inducibles KO-*Eng* endoteliales inmortales de pulmón (MLEC2) se obtuvo de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>/Rosa-Cre<sup>ERT</sup>* en el laboratorio de la Doctora Helen Arthur (Newcastle Upon Tyne, UK). Se considera línea celular inmortal por contener el gen *SV40 Tag* (*Simian Virus 40-large Tumor Antigen*) sensible a temperatura. A 33°C y en presencia de IFN $\gamma$  10 $\mu$ g/mL, la activación del *SV40* permite evitar el punto de control G1 del ciclo celular incrementando la proliferación y la velocidad de crecimiento celular. A 37°C vuelve a un estado con las características normales de célula primaria, mientras que a 39,5°C el *SV40 Tag* se degrada (Jat y col. 1991). El tratamiento de estas células *in vitro* con 4-OH-tamoxifeno, en medio MV2 completo con 10% FBS durante 48 horas, activa la Cre-recombinasa dirigida por el promotor ubicuo Rosa26, que recombina los sitios específicos *LoxP*, causando la delección de los exones 5 y 6 del gen de endogлина, y por tanto su inactivación (KO-MLEC2) (Figuras 20 y 21). El tratamiento con solEng 100ng/mL durante



24h en medio condicionado MV2 sin suero se realizó sobre las MLEC2 pretratadas o no con OH-tamoxifeno y a 37°C. El sobrenadante del medio de las cuatro condiciones: células inducibles KO-Eng control (c-MLEC2); células inducibles KO-Eng KO (KO-MLEC2); y ambos tipos tratadas o no con solEng, fue el utilizado en los ensayos de los *arrays* angiogénicos previamente descritos.

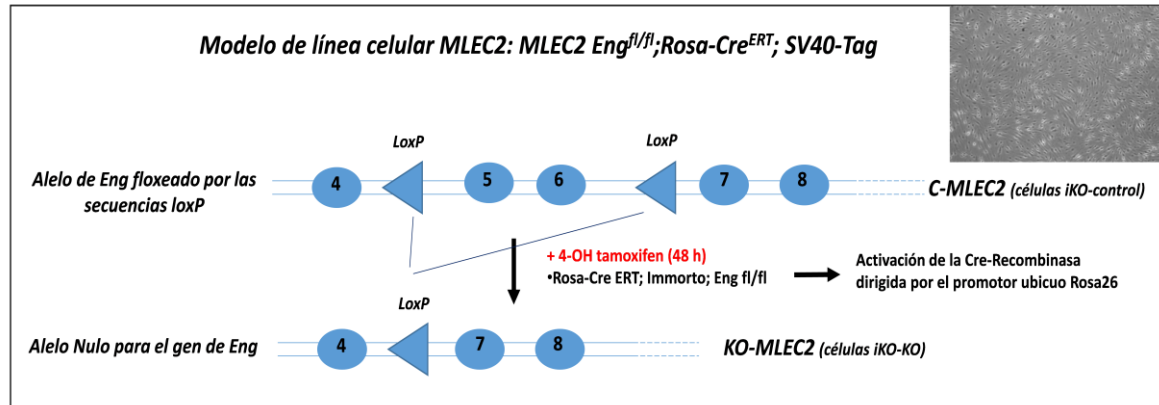


Figura 20. Esquema del modelo genético de células endoteliales de pulmón de ratón, MLEC2, inducibles KO para el gen de *Eng* y foto del cultivo a 10 aumentos.

En presencia de 4-OH tamoxifeno se activa la Cre-recombinasa y se deletionan los exones 5 y 6 del gen de *Eng*.

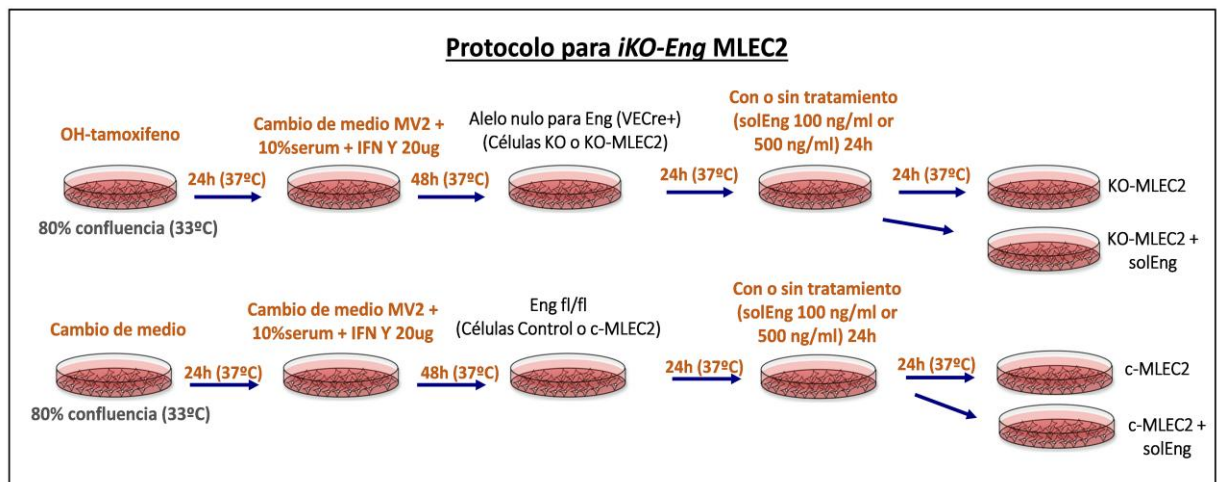


Figura 21. Esquema del protocolo general seguido para inducir la represión del gen de *Eng* y posterior tratamiento de las células MLEC2.

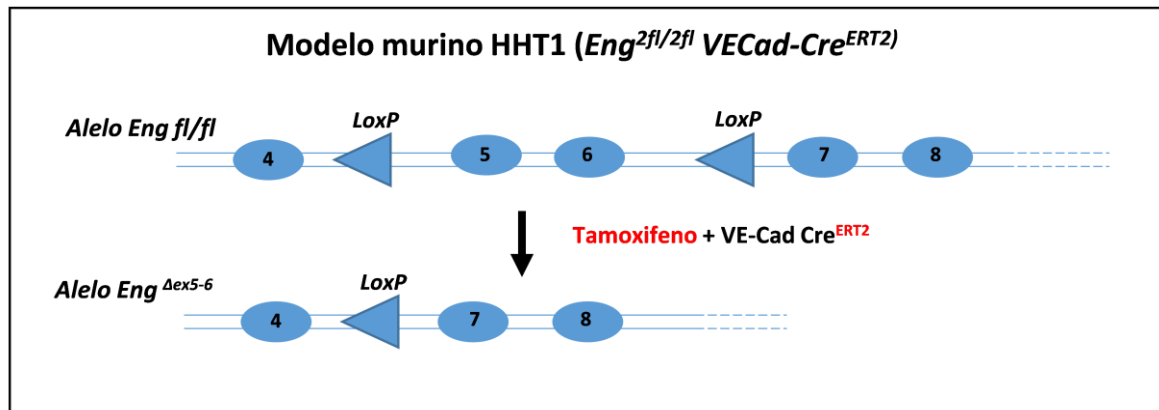


## 20. Modelo murino inducible KO para el gen *Eng*, o “HHT1” ( $ENG^{2FL/2FL} VE-CadCRE^{ERT2}$ ) y tratamiento intra-ocular.

El modelo murino  $Eng^{2fl/2fl}$  que se generó por Allinson y col., (2007) en el laboratorio de la Dra. Helen Arthur (Newcastle, Reino Unido), presenta los exones 5 y 6 de ambos alelos para el gen de endogлина flanqueados por secuencias *loxP*. Además tiene la expresión de la recombinasa Cre ERT inducible por tamoxifeno bajo el control del promotor VE-Cadherina, limitando por tanto la expresión de la recombinasa a las células endoteliales (Monvoisin y col., 2006). Para activar la recombinasa o inducir la inactivación del gen de *Eng*, las crías de ratones fueron tratadas mediante inyección subcutánea (con jeringas de 0,5 mL y agujas de 29G BD-Micro-fine) con 15 mg/mL de tamoxifeno (Sigma) disuelto en etanol y en aceite de cacahuete (1 mg tamoxifeno + 10  $\mu$ L etanol + 56  $\mu$ L de aceite de cacahuete), a los días postnatales 2 y 4. A día post-natal 5 se realizó el procedimiento de inyección intra-ocular (IO), aprendido en el laboratorio del Dr. Marcus Fruttiger (UCL-Instituto de Oftalmología, Londres, UK), procedimiento que se realiza bajo lupa y con extractor, manteniendo a los ratones bajo anestesia por inhalación con un flujo continuo de 2,5 L/min de oxígeno y 3% Isoflurano-Vet. La inyección IO del ojo izquierdo se realizó con 100 ng/mL de solEng disuelta en PBS-0,1% BSA (0,3  $\mu$ L) y del derecho sólo con la solución control PBS-0,1% BSA. Para este protocolo tan preciso se utilizan unos fórceps y unas tijeras autoclavadas y de precisión y una inyección con jeringa Hamilton (80001 10  $\mu$ L SYR) acoplada a una aguja muy fina (*Needle PRE-33013 TSK Laboratory*, Japón). Las crías se mantuvieron en la caja de cría durante 2-3 días más, hasta el séptimo día (p7), momento en que se procedió a la extracción de las retinas

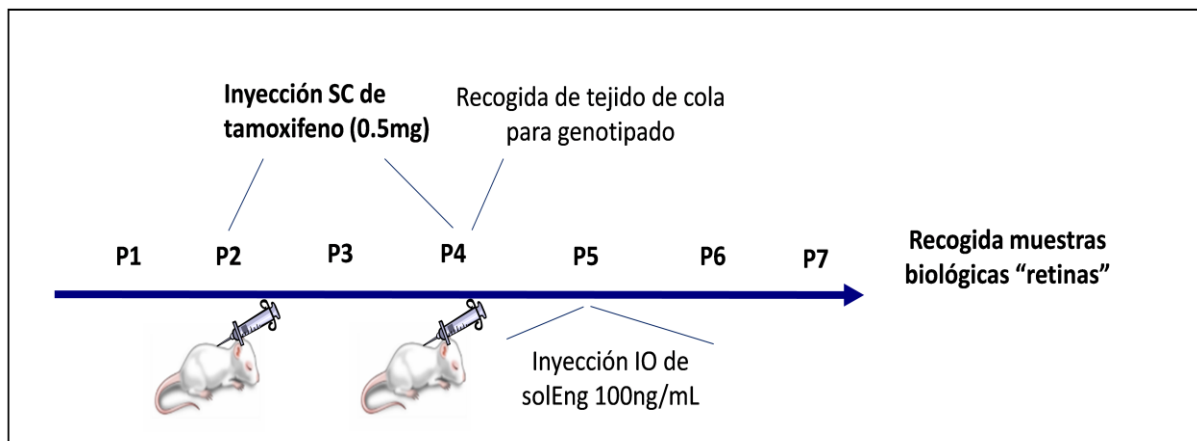
De este modelo murino además se obtuvieron las células endoteliales de pulmón (MLEC1) siguiendo el protocolo descrito por Sobczak y col., 2010. Se aislaron las células endoteliales con ayuda de bolas magnéticas-IgG unidas al anticuerpo anti CD31 o PECAM, a partir de la extracción y posterior disociación del tejido de pulmón con 1mg/mL de colagenasa a 37°C. Estas células endoteliales seleccionadas se cultivaron y controlaron durante varios días en medio VM2 con 10%FBS, antes de utilizarse para los experimentos con tratamiento de solEng.

Los experimentos realizados con este modelo animal se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. Helen Arthur (*Biomedicine-Newcastle International Life-Science Centre, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido*), durante mis dos estancias de un total de 10 meses en 2014 y 2015 financiadas dentro del programa de movilidad de mi beca FPI.



**Figura 22.** Esquema del modelo murino genético inducible KO para *Eng* en células endoteliales.

En presencia tamoxifeno y activación de Cre-recombinasa, se deletan los exones 5 y 6 del gen de *Eng* dando lugar al genotipo KO para el gen de *Eng*.



**Figura 23.** Esquema del protocolo general seguido para inducir la represión del gen de *Eng* en el modelo murino  $Eng^{2fl/2fl} VECad-Cre^{ERT2}$ .

En los días post-natales p2 y p4 se inyecta de forma subcutánea tamoxifeno para inducir la activación de Cre. En el día p4-tardío o p5 se realiza el tratamiento de forma intra-ocular de solEng y en p7 se sacrifica al animal para la posterior extracción de las retinas.

## 21. Genotipado de los ratones.

El genotipado de los ratones se realizó a los 4 o 5 días después de su nacimiento (p4 o p5), siguiendo el protocolo descrito por Bourdeau y col., (2000). El DNA se extrajo de la porción final de la cola (2-3mm). El tejido se digirió en una solución alcalina de lisis (25 mM NaOH/0,2 mM EDTA, pH 12) y se incubó en un termociclador, en agitación durante un

mínimo de 30 minutos a 95°C, con la finalidad de ayudar a la degradación de las membranas y paredes celulares. A continuación, la muestra se centrifugó y al sobrenadante se le añadió una solución compuesta por 40 mM Tris-HCl, pH 5 para neutralizar el proceso y evitar la degradación del DNA obtenido. Con unos microlitros de la muestra de este DNA, se procedió a amplificar mediante PCR las distintas secuencias génicas. De forma rutinaria se amplificaron los genes *Cre*, para identificar aquellos ratones que expresaban la enzima Cre-recombinasa y considerados por tanto, homocigotos iKO para el gen de *Eng*; y el gen *Myo* (Miogenina) que se expresa de forma constitutiva, como control de carga de todas las muestras. La PCR se realizó utilizando los reactivos del kit *Hot Start Taq* (Qiagen). Los cebadores utilizados para esta PCR se muestran en la **Tabla 5**. Los productos de la PCR se mezclaron con naranja de acridina, agente intercalante de DNA, y se separaron con un gel de agarosa al 2% en TAE1X con bromuro de etidio, durante 30 minutos a 120 V por electroforesis. Para dilucidar los tamaños de las bandas de los productos génicos se utilizó la escalera de 1Kb de DNA (Invitrogen).

Cebador	Secuencia nucleotídica	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
<b><i>VECad-Cre Fw</i></b>	<b>GAACCTGATGGACATGTTTCAGG</b>	<b>320</b>
<b><i>VECad-Cre Rv</i></b>	<b>AGTGCGTTCGAACGCTAGAGCCTGT</b>	
<b><i>Myo Fw</i></b>	<b>TTACGTCCATCGTGGACAGC</b>	<b>250</b>
<b><i>Myo Rv</i></b>	<b>TGGGCTGGGTGTTAGCCTTA</b>	

**Tabla 5: Descripción de los cebadores utilizados para el genotipado del modelo animal.**

Se muestra la secuencia nucleotídica de los cebadores y el tamaño esperado de los fragmentos amplificados tras realizar la PCR. Abreviaturas: *Fw* (*Forward*, directo), *Rv* (*Reverse*, Reverso), WT (*Wild type*), pb (pares de bases).

Finalmente las bandas o fragmentos amplificados se visualizaron exponiendo el gel a luz UV y la captura de la imagen se realizó usando el equipo de quimioluminiscencia *GeneGnome System* y el programa informático *GeneSnap* (*Syngene Bio Imaging*).

## 22. Extracción, tinción y análisis de las retinas neonatales de ratón como modelo angiogénico.

El estudio del efecto de la solEng sobre la vasculogénesis, tanto en ratones transgénicos para el modelo HHT1 como controles, se efectuó analizando las retinas de estos animales.

### 22.1 Aislamiento y montaje de las retinas

El aislamiento de las retinas se realizó en el día p7, 48 horas después de la inyección intraocular del tratamiento. Las crías fueron anestesiadas con isofluorano inhalado y posteriormente sacrificadas por decapitación. Tras el sacrificio, se extrajeron los dos globos oculares con ayuda de unas tijeras y forceps de microcirugía (*Dumont*), cortando y eliminando tanto el tejido que lo rodea (conectivo) como el nervio óptico, siguiendo el protocolo descrito por Tual-Chalot y col., (2013). Un mínimo de 15 animales de cada condición fueron sacrificados y utilizados para los experimentos, siguiendo el principio de las 3 “Rs” de experimentación con animales (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). Los ojos recogidos para los experimentos de inmunofluorescencia se fijaron en 4% paraformaldehído (PFA) diluido en PBS2X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, fueron transferidos a PBS2X y mantenidos a 4-8°C mientras se diseccionaban y se extraía la retina. Bajo el microscopio, primero se eliminó la córnea y la lente, dejando el globo ocular sin humor vítreo y cóncavo. A continuación, se eliminó la membrana esclerótica, el coroides y los vasos hialoideos para obtener la retina lo más limpia posible. Las retinas una vez separadas y limpias, se guardaron en metanol a -20°C hasta su proceso de tinción.

### 22.2 Marcaje por inmunofluorescencia de la vasculatura de las retinas

Todos los anticuerpos, sus diluciones y las soluciones de bloqueo utilizadas en estos ensayos se detallan en la **Tabla 6**. Las retinas se bloquearon en solución de bloqueo PBS-TT-BSA (PBS1X, 1% BSA, 0,5% Tween, 0,3% Triton X-100, 5% suero de cabra) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación.

Para la tinción de endoglina de membrana, las retinas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal MJ7/18 anti-endoglina de ratón (eBioscience) diluido 1:100 en solución de bloqueo. Tras esta incubación, se lavaron 4 veces durante 10 minutos cada vez

con solución de lavado PBS-TT (PBS1X, 0,5% Tween, 0,3% Triton X100). Los siguientes pasos se realizaron en oscuridad. Las muestras se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 568 (dilución 1:200) y simultáneamente con Isolectina B4 conjugada con Alexa 488 para obtener un co-marcaje.

Para la tinción de actina de músculo liso (SMA), las retinas se incubaron simultáneamente con Isolectina B4-Alexa 488 y anti SMA-Cy3 conjugado con Alexa 594. Posteriormente fueron lavadas en oscuridad 4 veces, 10 minutos cada vez, con solución de lavado PBS-TT.

El montaje se realizó utilizando el medio *Prolong Gold Antifade Mountant*. Las muestras se guardaron en oscuridad, a 4°C, hasta ser fotografiadas. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en el *Institute of Genetic Medicine* (Newcastle upon Tyne, Reino Unido) y se realizaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META ajustando los tiempos de exposición para cada marcaje fluorescente y observando las imágenes con el programa informático ZEN de Zeiss.

Anticuerpo primario o secundario	Características	Dilución	Solución de bloqueo	Tª/tiempo incubación	Casa comercial
<b>Anti <math>\alpha</math>-SMA-Cy3</b>	Ac primario monoclonal de ratón conjugado con Cy3. Clon 1A4	1:100	PB-TT + 1%BSA	RT / 2h	Sigma
<b>Anti-endoglina</b>	Ac primario monoclonal de rata, Clon MJ7/18	1:100	PB-TT + 1%BSA + 5% de suero normal de cabra	4°C / toda la noche	eBioscience
<b>Isolectina GS-IB4-Alexa 488</b>	Ac primario conjugado con Alexa 488. Procede de <i>Griffonia simplicifolia</i>	1:50	PB-TT + 1%BSA	RT / 2h	Life Technologies
<b>Anti-rat-Alexa Fluor 568</b>	Ac secundario de cabra conjugado con Alexa 568.	1:200	PB-TT + 1%BSA	RT / 2h	Thermo Fisher

Tabla 6. Anticuerpos y condiciones utilizados para la tinción de las retinas por inmunofluorescencia.

### 22.3 Análisis estructural de la vasculatura de las retinas

Mediante el programa informático *FIJI-ImageJ2* (Schindelin y col., 2012) se realizaron varias medidas relacionadas con el proceso de angiogénesis de las imágenes tomadas de las retinas. Especificando y detallando cada medida realizada, se encuentran:

- Migración: medida que tiene en cuenta la ratio entre la longitud del radio vascular y el radio de la retina.
- Anchura y longitud de venas y arterias.
- Número de uniones capilares o vasos cerrados: Número de vasos cerrados contados en un área determinado y normalizados frente a esa área. Se realiza la medida de 3 áreas mínimo por retina para las medias.
- Número de ramificaciones (*sprouts*) o células endoteliales de los límites que se encuentran en migración activa: Cuantificación de las protusiones filopodiales en el límite de las retinas o de la red vascular.
- Densidad vascular: Medida que se obtiene teniendo en cuenta el área que ocupan todos los vasos en toda la retina.
- Intensidad en la vasculatura: teniendo en cuenta el marcaje de isolectina, endoglina y SMA.
- Anchura y largo de las malformaciones arteriovenosas (MAV) en los genotipos *KO-Eng*.
- Intensidad de los distintos marcajes sólo en las MAVs de los genotipos *KO-Eng*.
- Número de MAVs encontradas en el genotipo *KO-Eng* y área ocupada por estas MAV.

## 23. Aspectos legales (Experimentación animal).

Todos los experimentos realizados con los animales se llevaron a cabo siguiendo la guía relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, y aprobada por la directiva europea 2010/63/UE. Para la manipulación de los animales durante las estancias en Inglaterra, se siguió la guía ASPA (*Animal Scientific Procedures, Act 1986*) de procedimientos científicos con los animales y la Ley del Bienestar animal 2006 en el Reino Unido.

Los estudios realizados en España fueron aprobados tanto por el comité de la Universidad de Salamanca como por el comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y siguiendo la guía específica de manejo y uso de animales de laboratorios en condiciones humanas y de salud en cada uno de los dos centros.

Según los requisitos de formación de personal, teniendo en cuenta la normativa de protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos al que se refiere el artículo 15 del RD 53/2013 BOE nº34 en España, la presente candidata a la obtención de doctor, fue reconocida como personal capacitado para realizar diferentes procedimientos con animales (Categoría B). Además, la doctoranda también realizó un programa de prácticas y curso impartido por la Universidad de Newcastle (Reino Unido) que le confirió el título acreditado por FELASA 003/03, siguiendo el RD 2010/63/EU (*European directive on the protection of animals used for scientific purposes*) y el consentimiento para trabajar en el animalario y poder realizar los experimentos con animales (cuyo diseño experimental fue aprobado por el comité de ética pertinente), en el Instituto de Medicina Genética (Newcastle Upon Tyne, Reino Unido).

## 24. Estadística.

Todos los resultados que se muestran en esta tesis son la media de varios experimentos o un experimento representativo de un mínimo de 3 repeticiones. El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando el test *t-Student*, considerando un valor de  $p < 0,05$  estadísticamente significativo. Las representaciones gráficas muestran la media  $\pm$  ESM (Error estándar medio) y en las figuras los valores estadísticamente significativos están marcados con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ;  $p < 0.005$ ; ns: no significativo).

El análisis estadístico de las retinas entre los distintos genotipos y tratamientos se realizó utilizando el programa informático *SPSS*. Los datos no paramétricos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con el estadístico de Chi cuadrado. Si las varianzas no son homogéneas (estadístico de *Levene*) entre los distintos grupos, se realiza el test posterior de comparaciones múltiples *Tamhane*. Si por el contrario los valores cumplen la homogeneidad de las varianzas, se realiza el test de *Bonferroni*. Para la comparación de menos de tres grupos se utiliza el test de ANOVA. Para todos los casos la diferencia de medias se considera significativa si el valor de  $p < 0,05$ .

**Tabla 7. Líneas y cultivos primarios celulares utilizados y nombrados a lo largo de esta tesis**

Nombre	Tipo celular	Procedencia
<b>HUVECs</b> ( <i>Human Umbilical vein endothelial cells</i> )	Cultivo primario	Lonza
<b>HEK293T</b> ( <i>Human Epithelial Kidney</i> )	Línea celular	ATCC
<b>HMEC-1</b> ( <i>Human Microvascular Endothelial Cells</i> )	Línea celular	Lonza
<b>MLEC1</b> ( <i>Murine Lung Endothelial Cells</i> )	Cultivo primario	C57BL/6 Eng fl/fl VeCre-ERT2
<b>MLEC2</b> ( <i>Murine Lung Endothelial Cells</i> ) - tamoxifeno: <b>c-MLEC2</b> + tamoxifeno: <b>KO-MLEC2</b>	"Cultivo primario/Línea celular" inmortalizado sensible a temperatura	C57BL/6 Eng fl/fl; RosaCre-ERT





# *RESULTADOS*

*Te pasas años y años investigando y, de repente, en un suspiro das con un descubrimiento y eres consciente, por primera vez en tu vida, de que conoces algo que a esa misma hora y ese mismo día nadie más sabe.*  
(Judah Folkman)

*Todo parece imposible, hasta que se hace.*



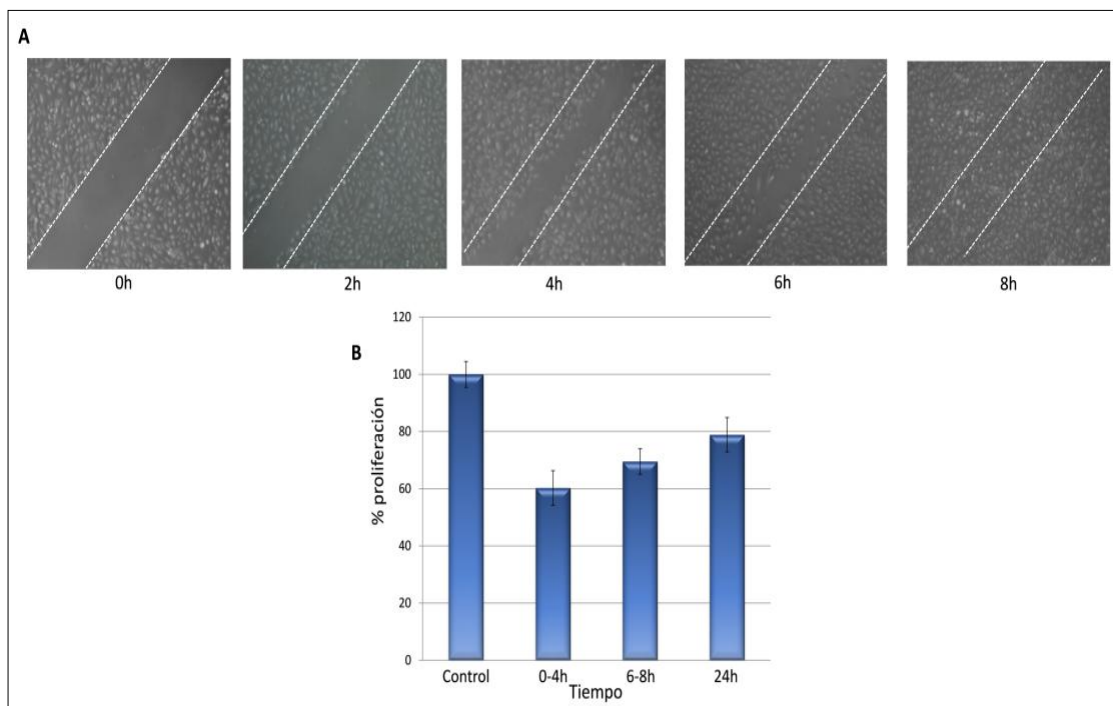
## RESULTADOS

### 1. Efecto del daño endotelial sobre la expresión de endoglina y MMP14 de membrana y la liberación de endoglina soluble (solEng) al medio.

Se estudió la regulación de la metaloproteasa MMP14 y su acción sobre endoglina de membrana que libera su forma soluble en respuesta al daño endotelial. Se analizó también la interacción entre estas dos proteínas mediante estudios de co-localización e inmunoprecipitación y cómo su expresión está regulada por el factor de transcripción KLF6.

#### 1.1 La expresión de endoglina y MMP14 aumentan durante el daño endotelial

Con el objetivo de analizar la expresión de Endoglina y de MMP14, tanto a nivel génico (mRNA) como a nivel proteico durante el daño endotelial, se utilizó como modelo *in vitro* una monocapa de células HUVECs a la que se le realizó una herida con una punta de pipeta (**Figura 24A**). Se tomaron muestras a distintos tiempos: desde el momento 0h hasta el cierre total de la herida (8-10h). En este proceso se involucran tanto la migración celular, como la proliferación, aunque esta última en menor medida (**Figura 24B**), ya que el crecimiento de las HUVECs se inhibe por contacto y el punto de partida es una monocapa al 90% de confluencia. La gráfica muestra cómo en el intervalo de tiempo que se estudia en la tesis más exhaustivamente, que es entre 0h-8h, la proliferación celular tras la herida aumenta de forma no significativa en un 5% como máximo, indicando que los efectos que se observan de reparación de herida endotelial son debidos a la activación de la migración durante el cierre y no a la proliferación celular, que en el caso de producirse en ese intervalo de tiempo, se debería a las células de fuera de la herida.



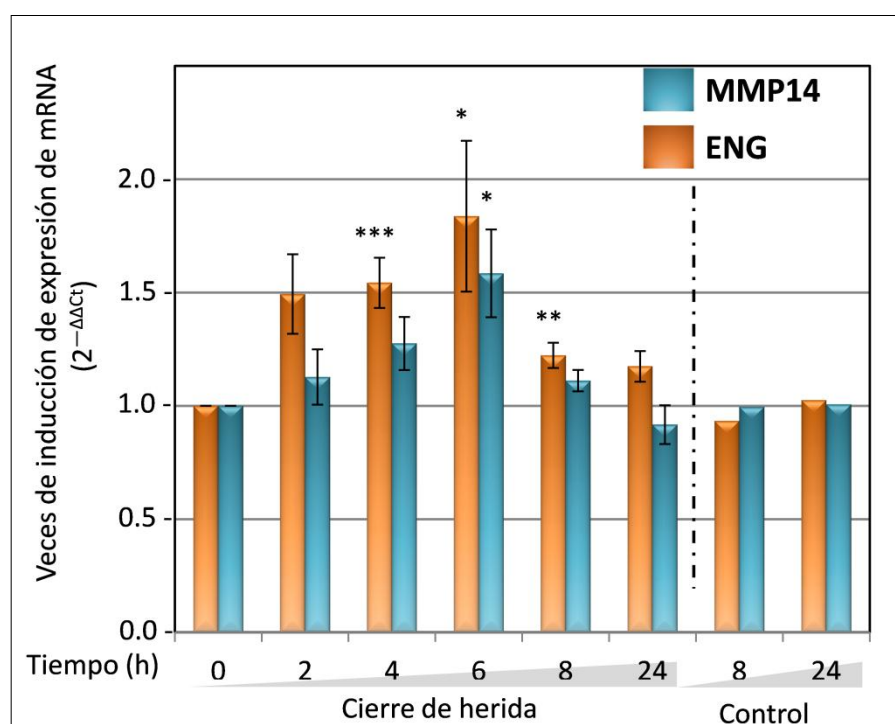
**Figura 24:** La migraci3n celular y no la proliferaci3n, contribuye a la reparaci3n de la herida despu3s del da3o endotelial.

**A.** Cultivo primario de monocapa de c3lulas HUVECs sometidos a da3o *in vitro* mediante la realizaci3n de una herida. Con este modelo se estudi3 la expresi3n proteica que se explica m3s adelante. **B.** Porcentaje relativo de c3lulas que proliferan durante el proceso de cierre de la herida referido al control teniendo en cuenta que la condici3n Control son c3lulas en monocapa sin da3ar; el resto de las condiciones muestran el porcentaje total de c3lulas normalizado frente al control, que quedan tras realizar m3ltiples heridas y contabilizando este n3mero de c3lulas o niveles proteicos a distintos intervalos de tiempo (0-4h, 6-8h y 24h). La cantidad de prote3na total se midi3 mediante la sonda CFSE. En la figura se representa un experimento representativo de varios.

Siguiendo este protocolo de denudaci3n endotelial, se estudi3 la expresi3n g3nica y proteica de endoglina y MMP14, as3 como el posible factor de transcripci3n que pudiera estar involucrado en su regulaci3n.

Primero se estudi3 la expresi3n g3nica de ambos genes, tanto de endoglina como de MMP14 mediante RT-PCR cuantitativa, con la finalidad de comprobar si se comportaban de una manera similar en cuanto a cin3tica de expresi3n. Como se puede observar en la **Figura 25**, los niveles de expresi3n g3nica de *ENG* y *MMP14* aumentan en las horas centrales de cierre de herida, confirmando el aumento de *ENG* descrito anteriormente en el laboratorio por Botella y col. (2002). Existen, adem3s, diferencias estad3sticamente significativas en el aumento a nivel g3nico de *MMP14* entre 1,5-2 veces respecto al control. Este resultado indica por tanto, que la expresi3n, al menos a nivel g3nico de MMP14, al ser una metaloproteasa implicada en la degradaci3n de matriz extracelular,

cumple un papel fundamental durante la migración activa del cierre de herida en el endotelio.

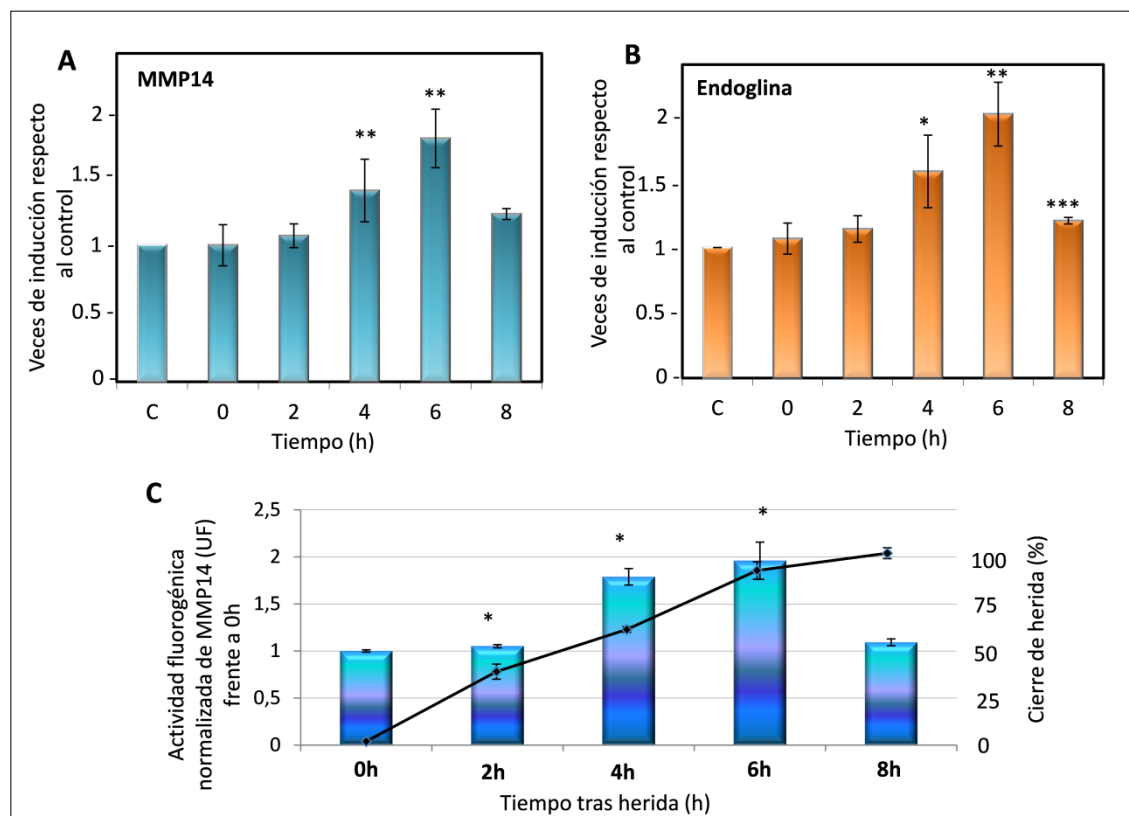


**Figura 25:** Los niveles de transcritos de *ENG* y *MMP14* aumentan en las horas centrales del daño endotelial *in vitro*.

Análisis por qRT-PCR de los transcritos de *ENG* y de *MMP14* en células HUVECs a distintos tiempos tras realizar el daño endotelial *in vitro*. Todos los datos están normalizados frente a los niveles de mRNA *18S* de cada una de las condiciones y cuyos niveles no fluctúan durante este proceso. (\* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,005$ ).

Tras observar que este patrón de expresión génica de ambas proteínas durante el cierre de herida era similar, se analizó la expresión proteica a nivel de membrana, tanto de ENG como de MMP14 a distintas horas durante el daño endotelial mediante citometría de flujo (**Figura 26A, 26B**). Se pudo observar cómo los niveles de ambas proteínas aumentaban casi al doble en las horas centrales, siendo estadísticamente significativas estas diferencias y coincidiendo con el análisis de expresión de RNA anteriormente descrito. Además, para comprobar que este aumento de expresión de MMP14 durante el proceso de cicatrización a nivel endotelial coincidía con una mayor actividad catalítica de ésta (**Figura 26C**), se empleó como se describe en Materiales y Métodos, un péptido fluorogénico, sustrato de metaloproteasas: Mca-PLGL-Dpa-AR-NH<sub>2</sub>. Este péptido añadido a las HUVECs durante el proceso de migración celular tras el daño endotelial permitió evaluar el nivel de actividad de la metaloproteasa midiendo la intensidad de fluorescencia como consecuencia de su

corte, en el sobrenadante. Se observa que la metaloproteasa MMP14 es más activa en las horas centrales del proceso de reparación de herida endotelial, coincidiendo con una mayor activación del fenotipo migratorio de las HUVECs, ya que se trata de una colagenasa típica que facilitaría la degradación de proteínas de la matriz extracelular, representada por la gelatina, en nuestros experimentos.



**Figura 26: La expresión proteica de ENG y MMP14 aumentan en la membrana de HUVECs sometidas a un daño endotelial *in vitro*.**

**A y B:** Niveles de expresión en la membrana de HUVECs, de MMP14 y ENG a distintos tiempos tras realizar el daño endotelial *in vitro*, medidos por citometría de flujo. La expresión de ENG, como ya se describió en el laboratorio, aumenta en este proceso y nos sirve como control positivo. La expresión de MMP14 aumenta de una manera significativa en las horas centrales del cierre de herida, casi al doble, respecto al control sin herida. Ambos niveles de proteínas parecen volver a su estado basal cuando la herida está prácticamente cerrada. **C:** En paralelo se midió la actividad de MMP14 durante el daño endotelial mediante el péptido-sustrato fluorogénico de MMP14, Mca-PLGL-Dpa-AR-NH<sub>2</sub> añadido al medio de cultivo y determinando la fluorescencia. Así, se comprobó que esta actividad catalítica aumenta cuando la expresión de MMP14 es mayor y el cierre de herida está más activo. En esta última gráfica los datos están normalizados frente a los niveles de actividad basal (0h). (\*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,005).

## 1.2 La herida endotelial induce la co-localización a nivel de membrana de endoglina y MMP14 y como consecuencia se libera solEng al medio extracelular

El incremento paralelo de la expresión tanto de RNA como de proteína en los niveles de MMP14 y endoglina, así como el aumento de la actividad proteolítica de MMP14 observado durante el proceso de cicatrización de herida endotelial, nos llevó a comprobar si la MMP14, se dirigía durante este proceso migratorio hacia la endoglina de membrana y de esta forma, mediante corte proteolítico, liberar su forma soluble al medio.

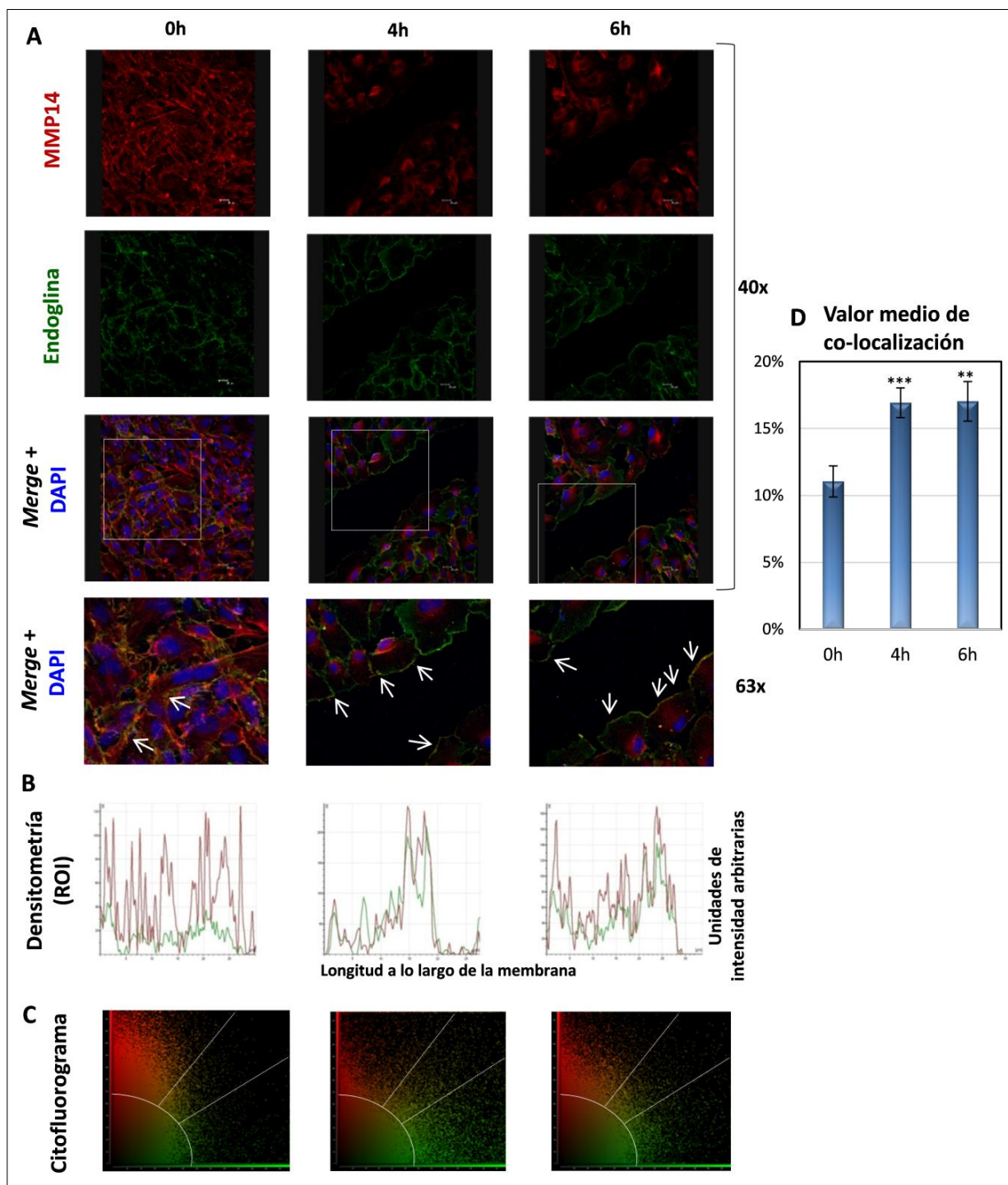
Para apoyar esta hipótesis, se estudió por inmunofluorescencia la distribución de ambas proteínas en la membrana de las células endoteliales utilizando la técnica de microscopía confocal. Con esta técnica se mide la expresión proteica, y se pueden observar mejor procesos de co-localización celular. Se comprobó cómo MMP14 y endoglina de membrana colocalizaban más y aumentaban su expresión durante las horas centrales de cierre de herida (4h-6h) que en la condición control (**Figura 27A**), periodo de tiempo que se asocia con una migración celular activa. En las imágenes donde se marcan ambas proteínas (*Merge*, 40X y 63X), se observa que el marcaje de endoglina, y especialmente el de MMP14, aumentan en las membranas de las células cercanas a la herida, límites donde la actividad migratoria endotelial es mayor. Comparando con la monocapa en condiciones basales (sin herida), se pueden ver punteados amarillos a lo largo de la membrana de las células, que indican co-localización de ambas proteínas. Con la finalidad de excluir en el límite de avance del cierre de herida de la monocapa de células, una potencial captura inespecífica de los anticuerpos secundarios utilizados, se realizó una tinción control en ausencia de anticuerpo primario que no mostró ninguna tinción positiva (datos no mostrados). En la **Figura 27B** se representa un ejemplo del perfil de densitometría de la expresión de ambas proteínas a lo largo de las membranas. Cuando estos perfiles de distribución son más o menos coincidentes o similares, indican co-localización o similitud de expresión en esos puntos de ambas proteínas. Esto se puede distinguir en las gráficas correspondientes a 4 y 6 horas durante el cierre de la herida. Por el contrario, una distribución irregular de expresión de ambas proteínas a lo largo de la membrana celular se encuentra en condiciones de reposo de la monocapa de HUVECs confluentes, indicando que esta co-localización no existe o es mucho menor.



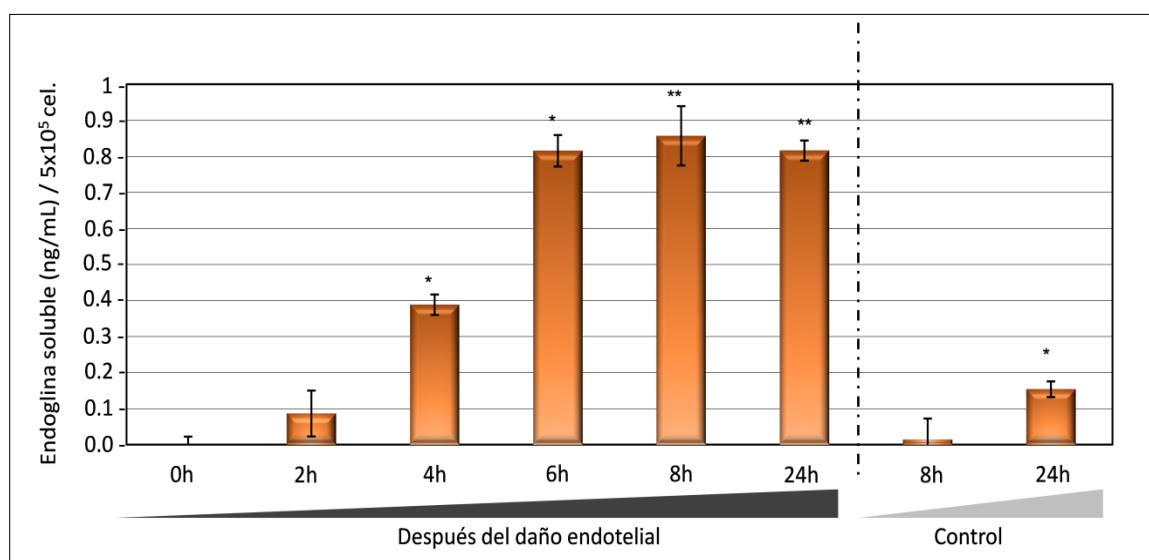
Con el propósito de analizar de una manera más cuantitativa la co-localización observada, se utilizaron los citofluorogramas 2D (gráficos de dispersión o de distribución conjunta), mediante los cuales se analizaron los valores de intensidad de los dos canales de detección, en las capas centrales que conforman la foto final del confocal (**Figura 27C**). Marcando nuestro fondo basal y los límites a partir de los cuales se consideraba co-localización (zona central entre ambas líneas rectas del citofluorograma, donde cada punto indica una relación directa de intensidad de ambos canales), se pudo obtener un valor numérico, representado en la **Figura 27D**, donde se percibe un aumento del área de co-localización/área total de fluorescencia a las 4 y 6 horas tras la herida con respecto al tiempo.

**Figura 27 (Página siguiente): ENG y MMP14 co-localizan a nivel de membrana en las HUVECs durante el daño endotelial *in vitro*.**

Se realizó una herida endotelial *in vitro* sobre las monocapas de HUVECs. MMP14 y endogлина fueron detectadas por inmunofluorescencia a los tiempos indicados. Las células se incubaron con Ac anti-Endogлина (P4A4) y/o Ac anti-MMP14, seguido de un Ac secundario acoplado a Alexa 488 (verde) o Alexa 647 (rojo) respectivamente. **A:** Fotografías de HUVECs donde se marcan endogлина o MMP14, así como imágenes con el doble marcaje y DAPI (marcador de núcleos-azul) a los aumentos indicados: 40X y 63X. Las flechas indican zonas de la membrana donde MMP14 y endogлина co-localizan (color amarillo). **B:** Histogramas representativos que muestran la intensidad de fluorescencia (perfiles densitométricos) de ambas señales en la membrana celular a las horas indicadas y a lo largo de una sección longitudinal de 30µm de largo, elegida al azar (señalada con flechas). **C:** Citofluorogramas en 2 dimensiones, donde se visualiza la distribución conjunta de los valores de intensidad de fluorescencia de los dos canales de detección de ambas proteínas marcadas en verde y rojo, que muestran la co-localización de MMP14 y endogлина. En estos citofluorogramas se muestran por un lado, dos nubes de puntos independientes correspondientes a cada uno de los canales de detección y por otro lado, una nube de puntos que se concentra sobre la recta de la diagonal del citofluorograma correspondiente a puntos de co-localización. **D:** Cuantificación en porcentaje de la co-localización de ambas proteínas obtenida de los citofluorogramas. (\*\*<0,01; \*\*\*<0,001).



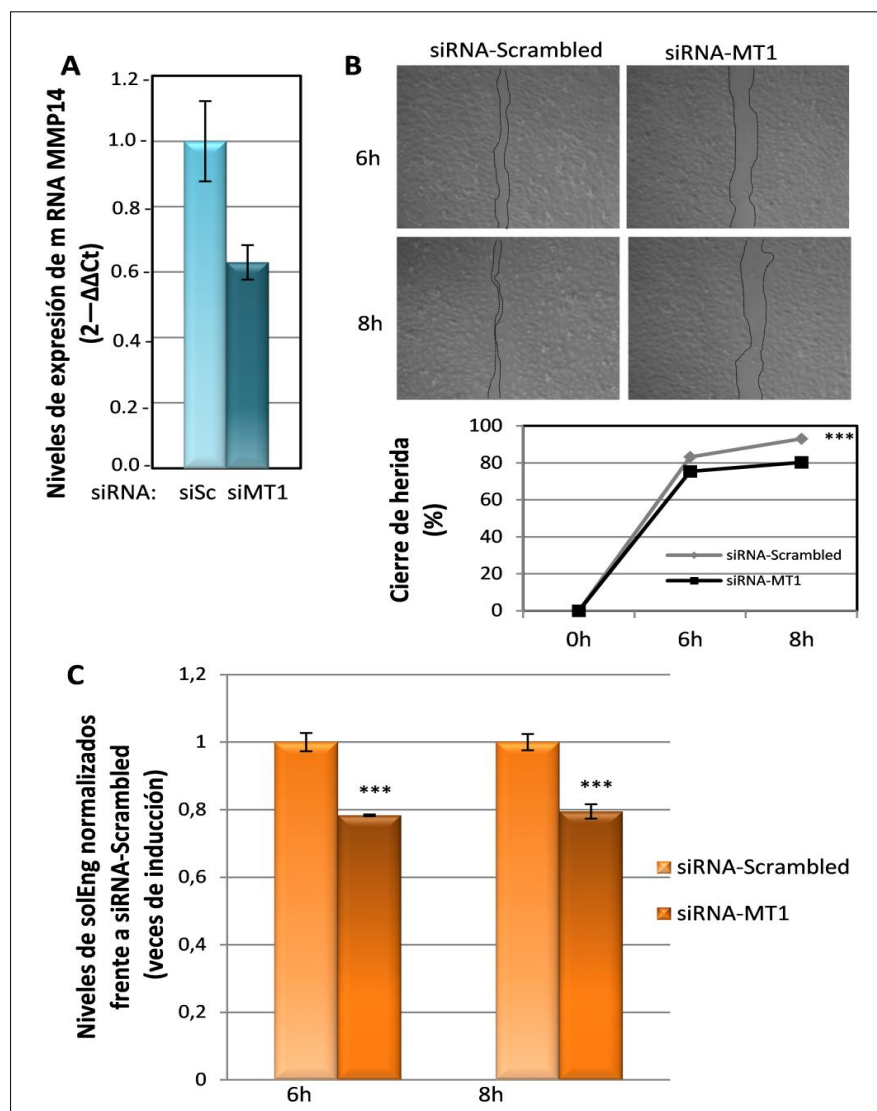
A continuación se evaluó si la co-localización de endoglina y MMP14 se correlacionaba con un aumento del corte de endoglina de membrana para secretar más solEng, tal como se ha descrito (Hawinkels y col., 2010; Valbuena-Díez y col., 2012). Tras medir mediante un ELISA los niveles de solEng en el sobrenadante de monocapas de HUVECs a distintas horas durante el cierre de herida (**Figura 28**), se observa que estos niveles aumentan claramente en las horas centrales del daño endotelial, llegando a su actividad de corte máximo a las 6h y 8h, cuando el cierre de herida está en su fase final. Este resultado coincide con el momento de mayor actividad de la metaloproteasa y el mayor aumento de co-localización entre la endoglina de membrana aún no cortada y MMP14, descrito anteriormente.



**Figura 28: La endoglina soluble se secreta al medio durante el cierre de herida endotelial.**

La monocapa de HUVECs fue sometida a daño endotelial y los sobrenadantes se recogieron a distintas horas durante el proceso de cierre de herida. Los niveles de solEng se midieron mediante la técnica de ELISA y se compararon con los niveles de monocapas sin herida (Control). Las concentraciones de solEng se normalizaron respecto a  $5 \times 10^5$  células. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Adicionalmente, la supresión de MMP14 mediante silenciamiento génico con siRNAs específicos (**Figura 29A**), dio lugar a una disminución de la velocidad del cierre de herida en monocapas de células endoteliales (**Figura 29B**). En condiciones normales el cierre del daño endotelial a las 6 y 8h es de un 85% y 95% respectivamente, por lo que la herida está prácticamente cerrada. Sin embargo el silenciamiento de MMP14 reduce esta velocidad de cierre hasta un 75% y 85% a las 6 y 8h respectivamente; lo cual indica el papel fundamental de MMP14 durante el proceso migración activa de las HUVECs. Además, se observó una disminución significativa de los niveles de endoglina soluble a las 6 y 8 horas después de la herida en comparación con los controles (**Figura 29C**), lo que sugiere un menor corte proteolítico específico de endoglina de membrana por esta metaloproteasa. En resumen, la supresión de MMP14 conlleva una disminución significativa en la velocidad del cierre de herida en monocapas de células endoteliales.

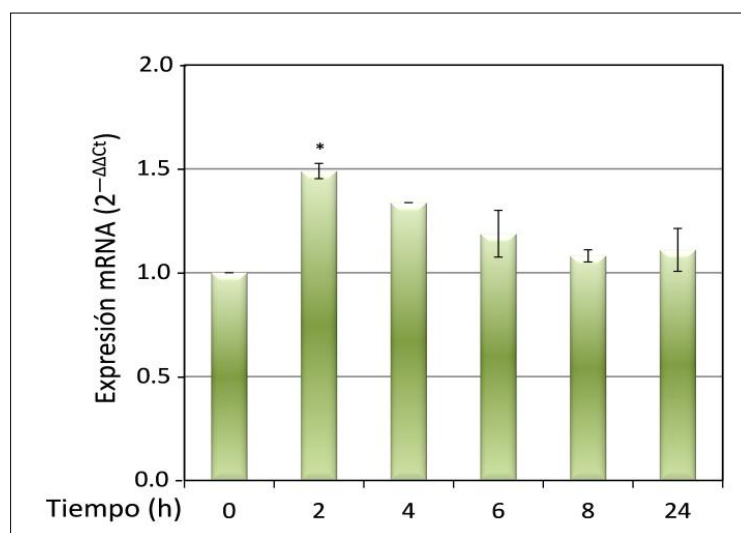


**Figura 29 (Página anterior): El silenciamiento génico de MMP14 reduce la migración durante el cierre de herida endotelial y disminuye los niveles de solEng liberada al medio.**

Las HUVECs se nucleofectaron con una mezcla de tres siRNA de MMP14 (siRNA-MT1) o Scrambled siRNA como control negativo de nucleofección (siRNA-Scrambled). A: Gráfica en la que se representan los niveles de transcritos de MMP14 tras la nucleofección de HUVECs con una eficiencia de alrededor del 40%. B: Fotografías a 5X aumentos de monocapas de células endoteliales nucleofectadas, dañadas *in vitro* a distintas horas del cierre de herida. La gráfica representa la diferencia en la velocidad del cierre de herida cuando las HUVECs se transfectan mediante nucleofección con siRNA-MT1 respecto a las controles. C: Niveles de solEng medidos a las 6h y 8h tras realizar el daño endotelial. Se observa cómo la supresión de MMP14 disminuye significativamente el fenotipo migratorio y la liberación de solEng al medio (\*\*p<0.001 respecto a la condición siRNA-Scrambled).

### 1.3 El factor de transcripción KLF6 incrementa la expresión de MMP14 tras el daño endotelial

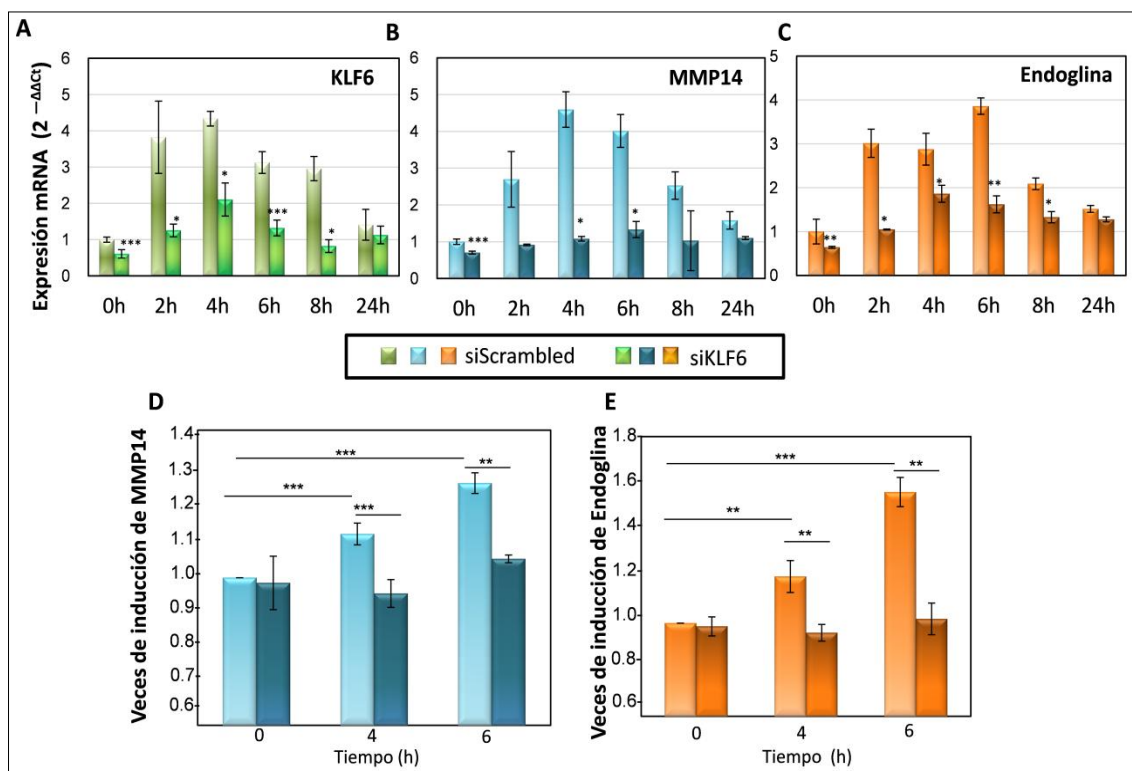
KLF6 es un factor de transcripción de respuesta temprana al daño que se encuentra aumentado al comienzo de la fase de activación en un modelo de daño endotelial, ya descrito anteriormente por Botella y col., (2002) y Garrido-Martín y col., (2013). En este trabajo se comprobó, que *KLF6* estaba sobreexpresado en los estadios iniciales del proceso de cierre de herida (**Figura 30**). Esta inducción de expresión génica que se produce en un intervalo de tiempo temprano, (a las 2h durante el cierre de herida), es compatible con el consiguiente aumento de expresión de *MMP14* (referido más arriba en nuestro modelo experimental) y de endoglina de membrana (anteriormente descrito por Botella y col., 2002).



**Figura 30: El factor de transcripción KLF6 aumenta en las etapas iniciales durante el cierre de herida.**

Análisis cuantitativo realizado por RT-PCR de los niveles del transcrito de *KLF6* en células HUVECs a distintos tiempos tras someter el cultivo al daño endotelial *in vitro*. A las 2 horas tras el daño endotelial, los niveles de KLF6 aumentan alrededor de 1,5 veces los niveles basales, volviendo a su nivel basal de forma progresiva según la herida se va cerrando. (\*p<0.05 respecto a la condición basal).

Curiosamente, la supresión de KLF6 en HUVECs (**Figura 31A**) inhibe marcadamente el aumento inducido de MMP14 y de endogлина durante el cierre de herida, y esto ocurre tanto a nivel de RNA mensajero (**Figura 31B y C**) como a nivel proteico (**Figura 31D y E**). Se comprobó mediante qRT-PCR que la eficacia de silenciamiento de KLF6 fue del 50%-60% aproximadamente, quedando por tanto una expresión génica basal neta de en torno al 40%. Bajo estas condiciones, el aumento que se produce de manera habitual, tanto a nivel génico como proteico de endogлина y MMP14, es parcialmente silenciado, hasta el punto en el que prácticamente no existen diferencias de expresión proteica a lo largo del cierre de herida. Esto demuestra que KLF6 está implicado en la expresión y la actividad de MMP14 y por tanto regulando la cicatrización y migración a nivel endotelial.



**Figura 31: El silenciamiento de KLF6 disminuye la expresión génica y proteica de MMP14 y endogлина durante el cierre de herida endotelial.**

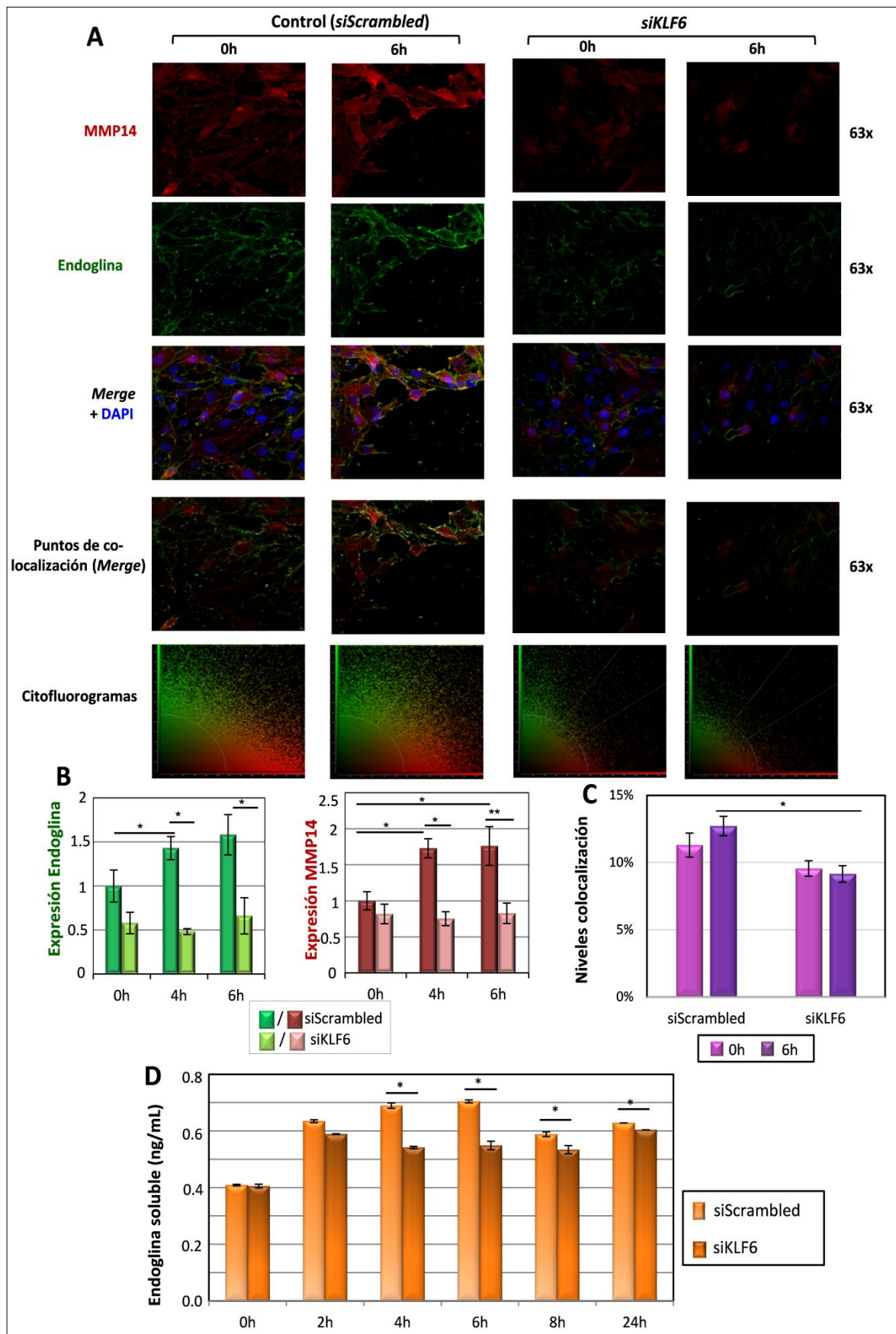
Las monocapas de HUVECs fueron nucleofectadas con siRNA específico contra el mRNA de KLF6 para silenciar la expresión de KLF6 y con siScrambled, como control negativo de nucleofección. A: Representación de los niveles génicos de KLF6 comparando HUVECs nucleofectadas con siScrambled y siKLF6 a distintas horas del cierre de herida. Con esta medida se comprobó la eficacia del silenciamiento que resultó ser alrededor del 40-50%. Tanto los niveles génicos de MMP14 (B) como de endogлина (C) se midieron durante el cierre de herida tras silenciar KLF6. Todos los resultados se normalizaron respecto a los niveles génicos de 18S (gen que no varía y se expresa de manera constitutiva durante el proceso de daño endotelial) a distintas horas. D y E: Expresión proteica normalizada frente a la condición basal (0h) de endogлина y MMP14 durante las horas centrales del cierre de herida tras ser nucleofectadas con o sin siRNA-KLF6. Se observa cómo en presencia del siRNA-KLF6 disminuye el aumento inducido de ambas proteínas durante las horas centrales del cierre de herida. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 respecto a la condición basal).

Por otra parte, se analizó cómo la supresión de KLF6 con siRNA específico conlleva una disminución en la tasa de co-localización de MMP14 y endogлина de la lesión endotelial, teniendo en cuenta que ya se parte de unos niveles basales disminuidos de MMP14 y endogлина tras el silenciamiento. En las fotografías de HUVECs silenciadas con *siKLF6* (Figura 32A), se observa cómo el punteado que marca la co-localización no aumenta a las 6 horas, como ocurre en condiciones normales (*siScrambled*). Además, tras realizar la medida de la co-localización mediante los citofluorogramas 2D, se observa de forma más cuantitativa este mismo resultado. Lo mismo que ocurre si se mide la expresión de endogлина y MMP14 de forma independiente por la fluorescencia emitida, ya que el aumento esperado no se produce durante las horas de migración endotelial más activa (Figura 32 A, B y C). Como consecuencia de una menor co-localización entre endogлина y MMP14 durante el cierre de herida cuando se silencia KLF6, los niveles de solEng liberada al medio a distintas horas disminuyen, en comparación con el aumento de solEng que se produce en condiciones normales durante este proceso (Figura 32D).

**Figura 32 (Página siguiente): El silenciamiento de KLF6 disminuye la co-localización de endogлина y MMP14 así como la secreción de solEng al medio durante el daño endotelial.**

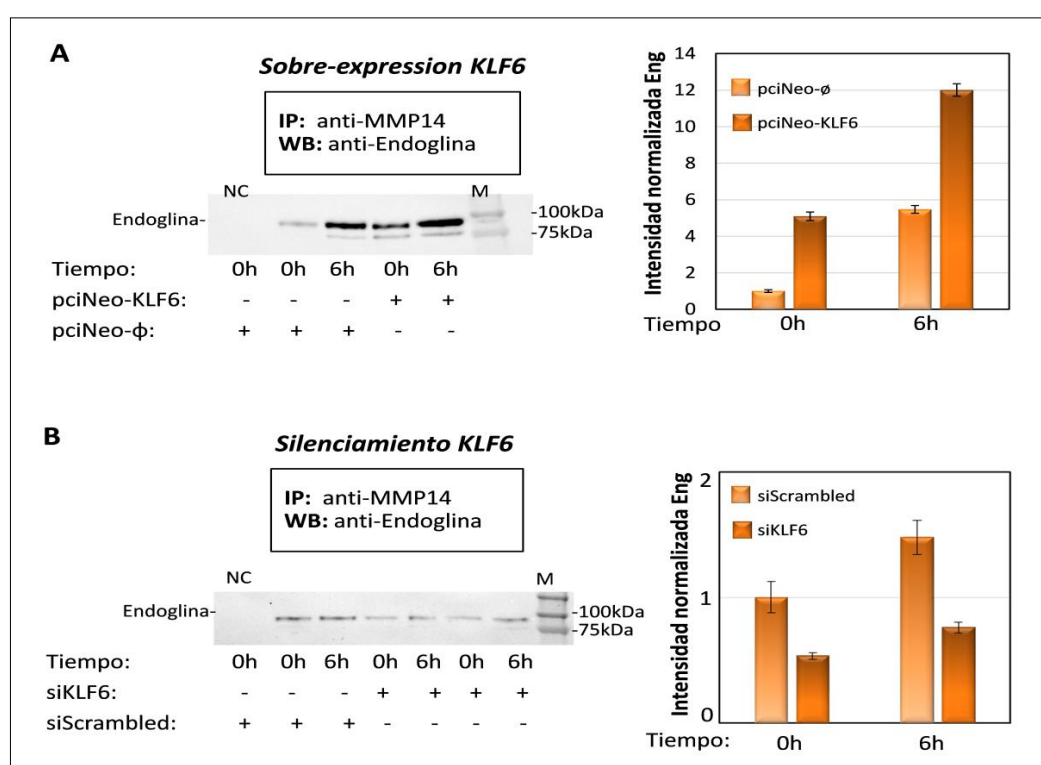
Se nucleofectaron las monocapas de HUVECs con siRNA específico contra el mRNA de *KLF6*, y con *siScrambled* como control y se les realizó el daño endotelial *in vitro*. La presencia de endogлина y MMP14 se detectó por inmunofluorescencia a distintos tiempos durante el cierre de la herida. Se marcan la endogлина en verde (con anticuerpo secundario Alexa 488) y la MMP14 en rojo (con anticuerpo secundario Alexa 647) A: Fotografías tomadas a 63X aumentos tanto de los marcajes individuales como de la fusión de ambos marcajes (*Merge*) con el núcleo teñido con DAPI. La co-localización se observa en los puntos amarillos de la tercera línea de imágenes o bien en blanco en la cuarta fila. Los citofluorogramas representan la co-localización. B: Cuantificación media de la expresión de endogлина y MMP14 normalizada respecto a la tinción nuclear (DAPI) de cada imagen. C: Cuantificación en porcentaje de la co-localización de endogлина y MMP14 obtenido de los citofluorogramas. D: Niveles de solEng medidos por ELISA de los sobrenadantes recolectados a distintas horas durante el cierre de la herida de HUVECs nucleofectadas. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecto a la condición basal).







Se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación e inmunodetección, que ayudaron a corroborar que KLF6 regula la expresión de endogлина y MMP14 durante el cierre de herida y por consiguiente la co-localización o asociación entre ambas proteínas. De esta forma, tras la inmunoprecipitación con anti-MMP14 en las HUVECs y posterior *Western Blot* con anti-endogлина, se detectó que la señal de endogлина en condiciones normales, aumentaba a las 6h tras la herida. Esta señal aumentó aún más cuando las HUVECs se nucleofectaron con el vector génico pCiNeo-KLF6, que sobreexpresa de forma ectópica *KLF6* (**Figura 33A**). Por el contrario, la intensidad de la señal de endogлина asociada a la MMP14 disminuyó tras silenciar KLF6 con siRNA específico (**Figura 33B**).

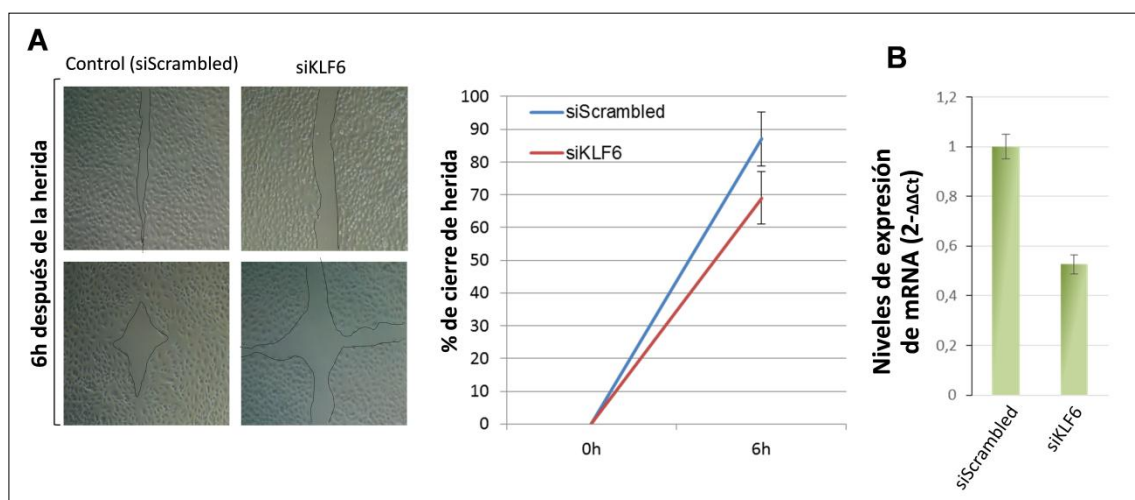


**Figura 33: Coimmunoprecipitación de endogлина y MMP14 tras silenciar o sobreexpresar KLF6 en HUVECs durante el daño endotelial.**

Se realizó un daño endotelial *in vitro* sobre la monocapa de HUVECs nucleofectadas o no 48h antes y se lisaron para extraer proteínas a tiempo basal (0h) y 6h después de la herida. Los lisados de células totales se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal anti-MMP14 acoplado a bolas magnéticas con proteína G. Los inmunoprecipitados se separaron con geles SDS-PAGE 8% de acrilamida en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, donde se detectó por *Western Blot* la expresión de endogлина mediante el anticuerpo monoclonal P4A4 y un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se revelaron las bandas y se cuantificó su intensidad. Un anticuerpo de isotipo IgG (mismo isotipo que anti-MMP14) fue utilizado como control negativo (CN) de IP. Los marcadores de peso molecular (M) se encuentran en la última columna de cada membrana. Los histogramas muestran la intensidad de las bandas de endogлина normalizadas frente a la condición basal de 0h nucleofectadas con los vectores vacíos. **A:** HUVECs nucleofectadas con el vector que sobreexpresa KLF6 (pciNeoKLF6) o su correspondiente vector vacío. A las 6 horas tras la herida la unión endogлина-MMP14 aumenta si las HUVECs sobreexpresan KLF6 respecto al aumento que se produce en condiciones normales. **B:** HUVECs nucleofectadas con

siRNA específico para KLF6 (siKLF6) o siScrambled como control. A las 6 horas tras la herida, la unión endoglina-MMP14 disminuye si en las HUVECs se silencia KLF6, respecto al aumento que se produce en condiciones normales.

Se realizó un experimento adicional con el fin de comprobar si la migración celular se veía afectada de forma directa por el simple hecho de silenciar KLF6 en las HUVECs. En la **Figura 34A** se muestra cómo la migración de las células HUVECs está ralentizada, en las horas centrales del cierre de herida, cuando son silenciadas con siRNA-KLF6 respecto a su control *siScrambled*. Así, las HUVECs/*siScrambled* migran alrededor de un 15% más que las HUVECs/*siRNA-KLF6*. Esto es una manera evidente de comprobar que el factor KLF6 juega un papel importante en todo este sistema celular modulando varias proteínas implicadas en la migración activa, como endoglina y MMP14, ya descrito en los resultados anteriores. Es importante tener en cuenta que las diferencias que se ven en el porcentaje de cierre son debidas al 50% de las HUVECs aproximadamente, dada la eficiencia de nucleofección (**Figura 34B**). Si esta eficacia de silenciamiento fuese del 100%, probablemente las diferencias serían mucho mayores.



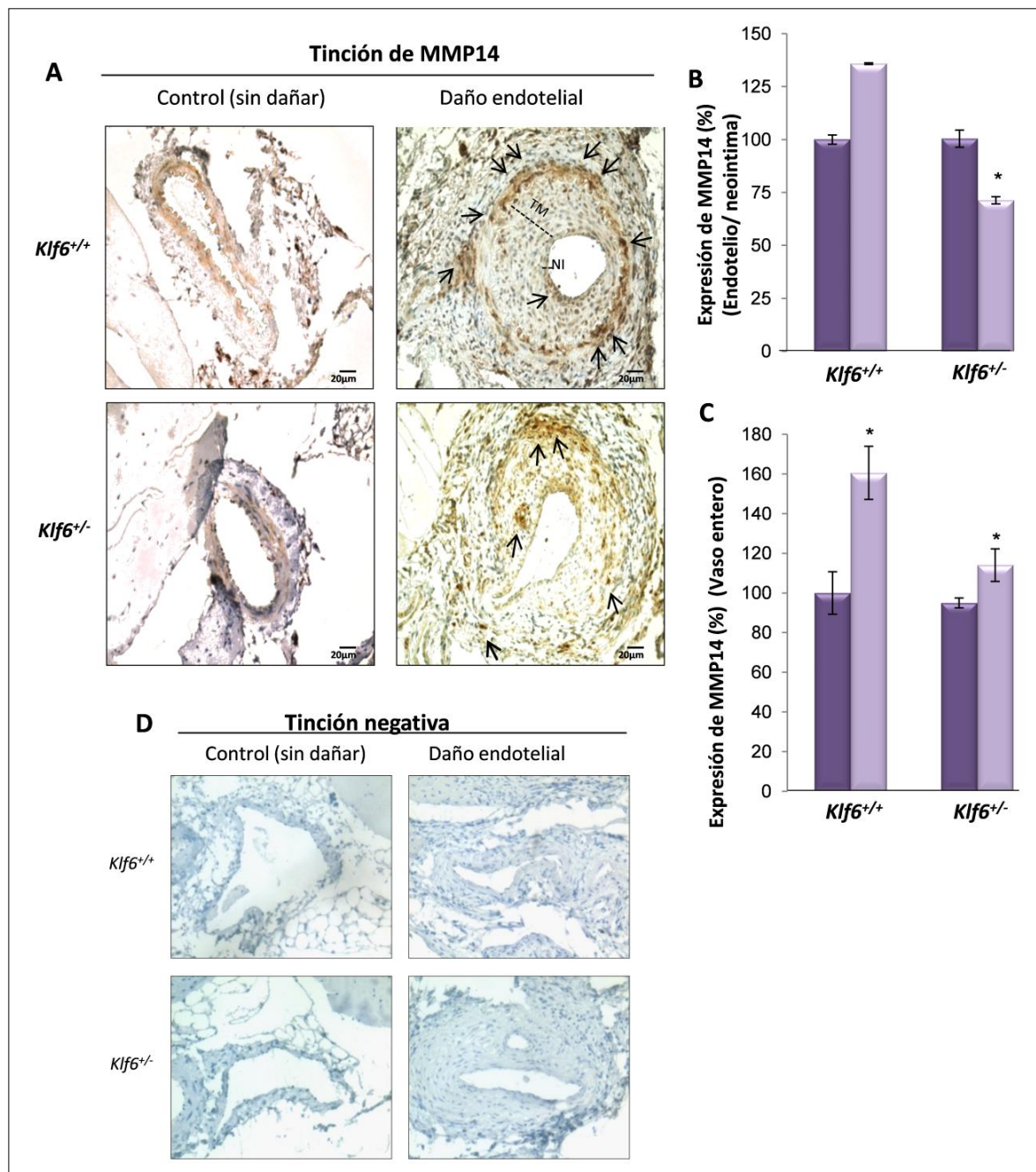
**Figura 34: Efecto del silenciamiento de KLF6 en HUVECs sobre la migración durante el proceso de cierre de herida endotelial.**

**A:** Las fotografías muestran de forma visual cómo la herida endotelial está más abierta en las HUVECs donde se ha silenciado KLF6 tomando como referencia una hora central durante el cierre de herida (6h). En el gráfico se muestra esta misma diferencia pero de una manera más cuantitativa y haciendo la media de varios experimentos. **B:** Niveles de expresión de mRNA de KLF6 en células HUVECs tras ser transfectadas mediante nucleofección con siRNA específicos para KLF6. Se observa una disminución de expresión de KLF6 de aproximadamente del 50% en células silenciadas (siKLF6) respecto las células controles (siScrambled).

### **1.4 Los ratones heterocigotos *klf6*<sup>+/-</sup> expresan menos niveles de MMP14 tras el daño endotelial.**

Teniendo en cuenta todas las observaciones y medidas anteriores, donde la disminución de la expresión de KLF6 *in vitro* en células endoteliales tiene como resultado una disminución en la transcripción y expresión proteica de MMP14, se quiso demostrar esta relación y dependencia estudiando un modelo *in vivo* que mimetizase estas condiciones. Para evaluar el efecto de esta supresión de *KLF6* sobre la expresión de MMP14 *in vivo*, se eligió un modelo de daño vascular realizado en la arteria femoral de ratones heterocigotos para KLF6 (*Klf6*<sup>+/-</sup>) y controles (*WT*), como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Cuatro semanas después de la eliminación de la túnica íntima endotelial de la arteria femoral, por el daño realizado con un alambre guía, tiempo suficiente según distintas publicaciones (Roque y col., 2000; Shoji y col., 2014; Moser y col., 2016) para poder observar proliferación endotelial, se sacrifica al ratón. El tejido de la arteria femoral, tanto de la extremidad dañada como de la no dañada, se extrajo y se incluyó en parafina para conservarlo y poder analizar la expresión de MMP14 por inmunohistoquímica (**Figura 35A**). El control negativo de esta inmunohistoquímica se muestra en la **Figura 35D**.

En los vasos sin herida de ambos modelos animales, tanto del fenotipo salvaje (*WT*, *Klf6*<sup>+/+</sup>) como de heterocigotos para KLF6 (*Klf6*<sup>+/-</sup>), la presencia de MMP14 era casi indetectable. Por el contrario, tal como habíamos visto en los experimentos *in vitro*, la expresión de MMP14 estaba claramente aumentada tras la lesión endotelial. En las fotografías se observa cómo en las lesiones vasculares, MMP14 se localiza principalmente en las células endoteliales de la neoíntima hiperplásica y en la túnica media más gruesa, esta última compuesta principalmente por células musculares. Curiosamente, como se muestra en los histogramas de la **Figura 35 B y C** de una manera más cuantitativa, la tinción de MMP14 en los vasos de los ratones heterocigotos para KLF6 se redujo significativamente con respecto al control de la misma camada de genotipo salvaje tras el daño endotelial. Para esta cuantificación y normalización se tuvo en cuenta la expresión en todo el vaso y el grosor del vaso completo (**Figura 35B**) o bien la expresión específica de MMP14 en el endotelio respecto al grosor de la neoíntima (**Figura 35C**). Estos resultados *in vivo* sugieren que KLF6 está implicado en la regulación de la expresión de MMP14, proteína con un papel importante en la migración y reparación endotelial y que aumenta cuando existe un proceso de migración, activación y proliferación celular.

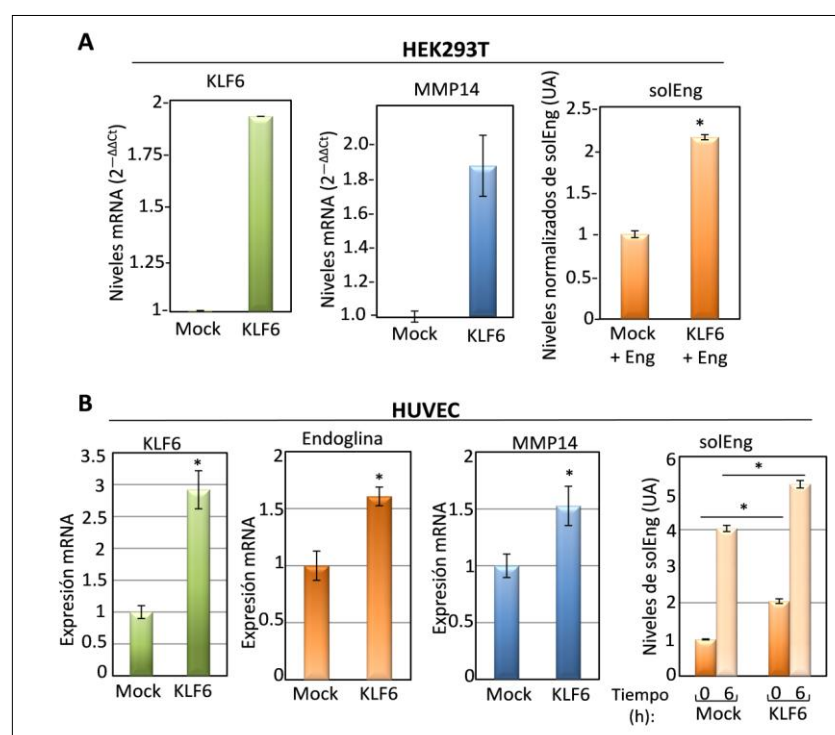


**Figura 35: La expresión de MMP14 es regulada por KLF6 y aumenta en la capa neoíntima de las arterias femorales de ratón sometidas a daño mecánico.**

**A:** Tinción inmunohistoquímica de MMP14 en secciones transversales de arterias femorales murinas, tras 4 semanas del daño mecánico interno del endotelio realizado con un alambre guía. Se comparan arterias de ratones heterocigotos para KLF6 (*Klf6<sup>+/+</sup>*) y controles WT para KLF6 (*Klf6<sup>+/+</sup>*). Las fotografías fueron tomadas a 25X aumentos. En los ratones WT, la expresión de MMP14 está aumentada (marcada con flechas) en la capa neoíntima y en la túnica media de las arterias femorales tras el daño mecánico, con respecto al aumento menos pronunciado en los ratones *Klf6<sup>+/-</sup>*. **B y C:** Histogramas que representan la expresión media de MMP14, teniendo en cuenta 5 muestras diferentes de las arterias femorales después del daño y comparando WT frente *Klf6<sup>+/-</sup>*. En el histograma del panel B se representa la expresión en todo el vaso, sin diferenciar entre capas y normalizada respecto al ancho total del vaso. En el histograma del panel C se representa la expresión de MMP14 específica del endotelio y normalizada respecto al ancho de la neoíntima. **D:** Controles negativos de cada condición de los cortes transversales de las arterias, en ausencia de anticuerpo primario. (\* $p < 0,05$  respecto a la condición control). NI: Neoíntima; TM: Túnica Media.

### 1.5 El gen *MMP14* es una diana transcripcional del factor KLF6

Para confirmar que *MMP14* es una diana transcripcional de KLF6 se realizaron experimentos de transfección transitoria en células HEK293T (**Figura 36A**). La expresión ectópica de KLF6 da lugar a un claro aumento de los niveles de transcritos de *MMP14* endógeno, tal como se demuestra por cuantificación mediante qRT-PCR. Igualmente, el aumento de expresión simultánea de *KLF6* y *ENG* se asocia con mayores niveles de endoglina soluble como consecuencia del aumento de *MMP14* endógena. Además, la sobreexpresión de KLF6 en HUVECs (**Figura 36B**) aumenta los niveles de transcritos endógenos de *ENG* y de *MMP14*, de acuerdo a lo observado anteriormente, así como los niveles de endoglina soluble en condiciones basales y tras las 6 horas durante el proceso de cierre de herida. Estos resultados están de acuerdo con los experimentos de silenciamiento descritos en apartados anteriores y sugieren que la sobreexpresión de *KLF6* aumenta *MMP14* y *ENG*, y como resultado se produce el corte proteolítico de endoglina de membrana y la consecuente liberación de la forma soluble al medio de cultivo.



**Figura 36:** La sobreexpresión de KLF6 aumenta los niveles del transcrito de *MMP14* y como consecuencia el aumento de la liberación de solEng al medio.

**A:** Las células HEK293T se transfectaron con vectores de expresión de KLF6 (pciNeoKLF6), endoglina (Eng) o el vector vacío (condición *Mock*). Se cuantificaron por qRT-PCR los niveles de los transcritos de *KLF6* ectópico y de

*MMP14* endógena. Los niveles de solEng liberada al medio se midieron por ELISA. **B:** Las HUVECs fueron transfectadas por nucleofección con el vector que sobreexpresa KLF6 (pciNeoKLF6) o el vector vacío (condición *Mock*). Mediante qRT-PCR se cuantificaron los niveles de transcritos de *KLF6*, *MMP14* y *ENG* endógenos. Los niveles de solEng liberada al medio se midieron por ELISA, tanto a las 0h como a las 6h durante el proceso de cierre de herida endotelial. Como consecuencia, la sobreexpresión de KLF6 aumenta los niveles de mRNA de *MMP14* y la liberación de solEng al medio. (\* $p < 0,05$  respecto a la condición *Mock*).

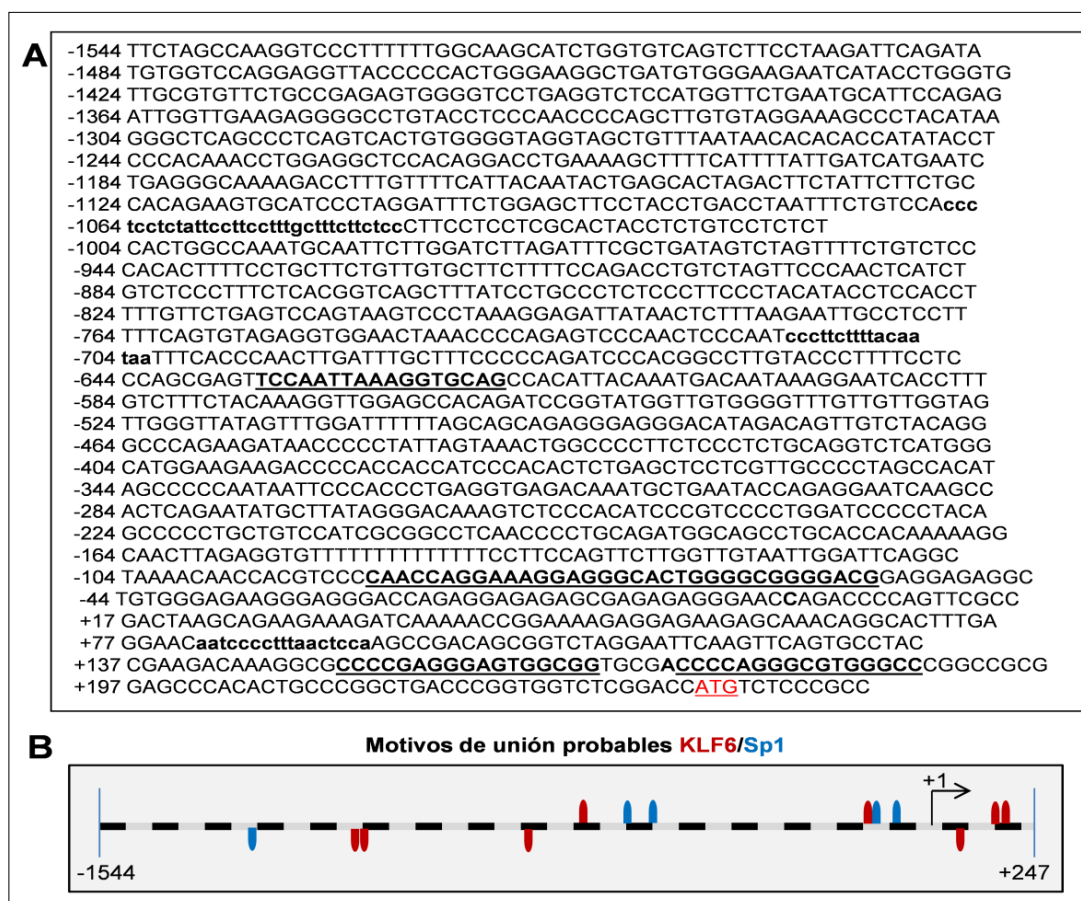
### **1.6 KLF6 interacciona con la secuencia promotora del gen *MMP14* (-1544/+247) en células endoteliales *in vivo*.**

Para analizar si la región del promotor génico humano de *MMP14*, correspondiente a la secuencia -1544/+247, contiene sitios putativos de unión para KLF6, se realizó un análisis *in silico* de esta región promotora proximal 5' mediante el software Genomatix MatInspector (**Figura 37A y B**). Con este análisis se encontraron 9 motivos consensos probables de unión para la familia de los factores de transcripción KLF, que se identificaron en las posiciones -1067, -1048, -718, -635, -86, -65, +83, +152 y +175. Debido a que el factor de transcripción Sp1 es capaz de cooperar con KLF6, tal y como se ha descrito en otros promotores como el de *ACVRL1* (Garrido-Martín y col., 2010), se identificaron en la región 5' del promotor de *MMP14*, motivos consensos teóricos de unión para el factor de transcripción Sp1 en las posiciones -1265, -546, -496, -70, -38. (**Figura 37A y B**). Este estudio de sitios teóricos de unión a la secuencia promotora de *MMP14* humano también se realizó con la misma secuencia génica promotora de ratón (datos no mostrados), hallándose 11 y 6 motivos consensos probables de unión para KLF y Sp1, respectivamente.

**Figura 37 (Página siguiente): Análisis *in silico* de los motivos probables de unión de KLF6 al promotor de *MMP14*.**

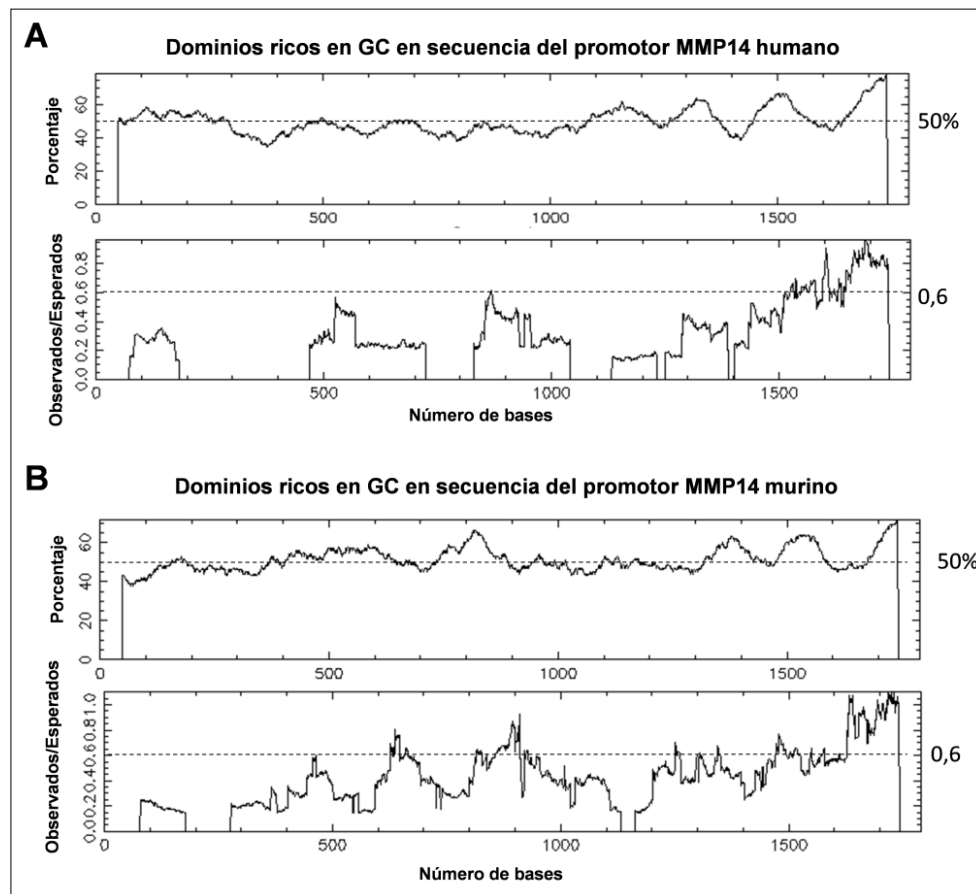
**A:** Secuencia proximal del promotor *MMP14* humano correspondiente a la región 5'-1544/+247-3'. En negrita se marcan los sitios teóricos probables de unión del promotor a KLF, en minúscula los motivos de unión que corresponden a la hebra negativa y en mayúscula a la hebra positiva. El inicio de transcripción está marcado en rojo. La numeración de los nucleótidos está referida al inicio teórico de la transcripción (+1). **B:** Esquema de sitios potenciales de unión a KLF6 (en rojo) y Sp1 (en azul) en el promotor génico de *MMP14*. Este análisis se realizó con el software Genomatix MatInspector.





El hecho de que todas las proteínas de la familia KLF se caractericen por tener dominios de unión conservados de DNA, que reconocen de manera preferente secuencias designadas como sitios Sp1 (cajas GC o elementos CACCC) de diversos genes diana (Andreoli y col., 2010), hace que la búsqueda de estas regiones sea importante para poder explicar los resultados obtenidos. Para encontrar las islas CpG donde hay mayor probabilidad de encontrar dominios ricos en GC para Sp1/KLF6, se utilizó el programa CpGPlot. Los criterios que considera el programa como regiones ricas en “islas CpG” son: 1) porcentaje total de nucleótidos G+C mayor del 50% en la secuencia; y 2) una relación de parejas 5'-GC-3' respecto del contenido total de toda la secuencia en GC (Razón Observado/Esperado) superior al 0,6 o 60%. Si se define estrictamente así, en esta región del promotor no hay presencia de estas islas, lo que indicaría un menor número de posibilidades de sitios de metilación en esta zona, aunque no se las descarta. Aun así, se encontraron varios dominios ricos en GC a lo largo del fragmento del promotor de MMP14 tanto humano como de ratón. Hay que tener en cuenta que la secuencia de humano con respecto a la de ratón tiene un porcentaje de identidad (número de coincidencias en las bases cada cien posiciones) de aproximadamente un 83%, según el programa de alineamientos múltiples

BLASTN2.6. Aun así, esto nos sirve para corroborar que en ambas secuencias, tanto en el humano (con la que se construyeron distintas secuencias del promotor) como en el de ratón (que puede dar una explicación a lo que se ha visto por IHQ), existen estas islas ricas en GC, y que por tanto indicarían posibles sitios de regulación transcripcional (**Figura 38 A y B**).



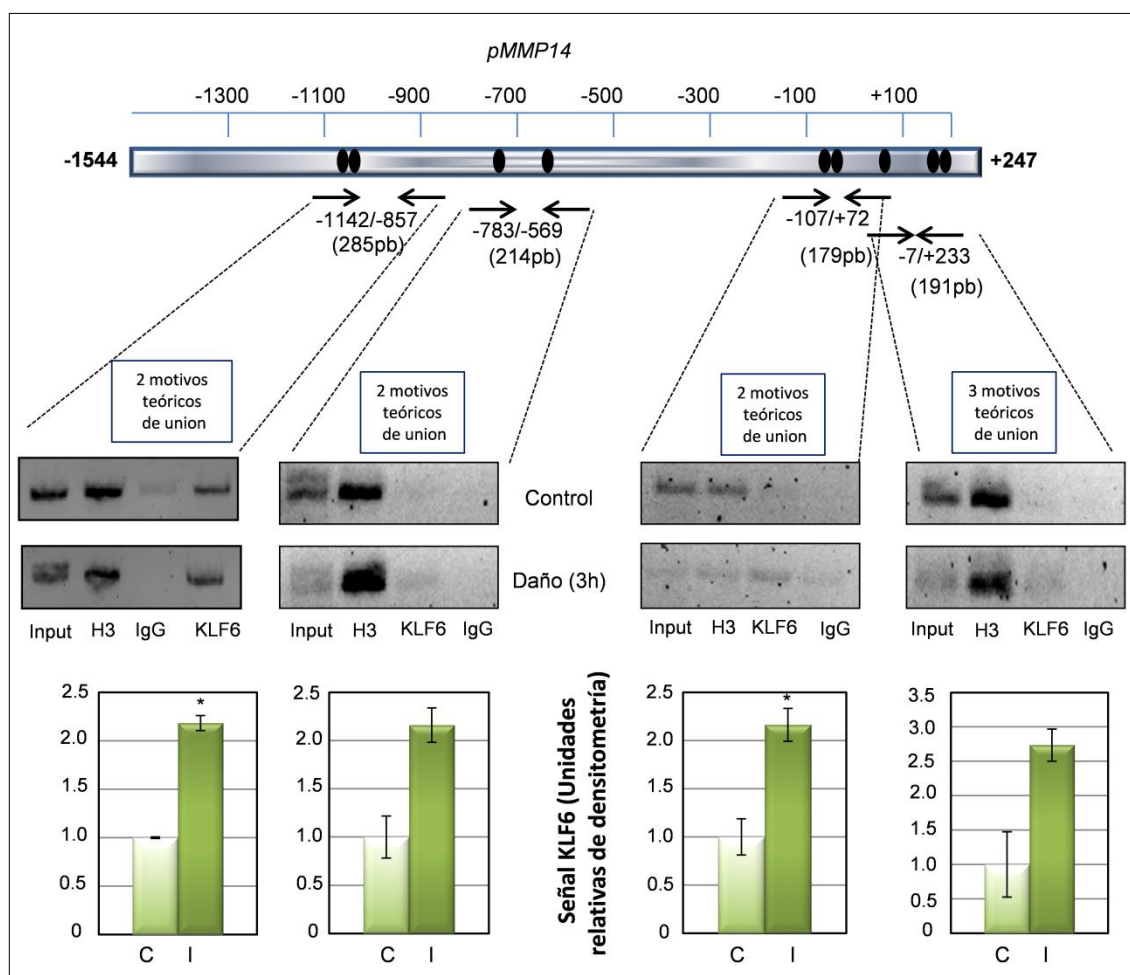
**Figura 38: Análisis in silico de los dominios ricos en GC en la secuencia -1544/+247 del promotor de MMP14.**

Representaciones esquemáticas de la presencia de residuos G (Guanina) y C (Citosina) en la región -1544/+247 del promotor de MMP14 de humano (A) y de ratón (B). En los gráficos de porcentaje se muestran las cajas GC que en teoría son dianas de miembros de la familia de factores de transcripción Sp1/KLF. Se analiza el porcentaje de residuos G+C respecto al total de residuos de la región. El programa informático CpGplot considera la existencia de islas CpG cuando este porcentaje supera el 50%. La otra gráfica (Observados/Esperados) muestra la presencia de dinucleótidos GC susceptibles de ser metilados en una región, cuando la relación entre los residuos GC reales (observados) y el total de esperados (calculado con el porcentaje de GC anteriormente descrito) es superior al 60% o 0,6 en una escala de 0-1, en el promotor MMP14.

Tras el análisis *in silico* de los sitios putativos de unión de KLF6 al promotor de *MMP14*, se estudió mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina la probable interacción física entre el factor de transcripción y la secuencia promotora *MMP14*. Se realizó un daño endotelial a las monocapas de HUVECs y los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-KLF6,



tanto en condiciones control (sin herida), como a las 3 horas de este daño. La cromatina inmunoprecipitada con anticuerpos anti-KLF6 fue sometida a PCR, usando diferentes parejas de oligonucleótidos que limitan 4 regiones diferentes ricas en posibles sitios de unión de KLF6 presentes a lo largo de la secuencia del promotor de *MMP14*. Como se muestra en la **Figura 39**, la unión de KLF6 al promotor de *MMP14* se detectó en los 4 fragmentos amplificados (-1142/857, -783/-569, -107/+72 y +7/+233) en condiciones basales, aunque la intensidad de algunos de estos fragmentos eran prácticamente inapreciable. Sin embargo 3 horas después de realizar el daño endotelial, la unión de KLF6 al promotor de *MMP14* se encontraba aumentada, como se muestra en el análisis densitométrico. Estos resultados indican que al menos uno de los motivos de unión de cada conjunto analizado es funcional y permite la unión de KLF6 a esa región promotora de *MMP14*.



**Figura 39: El factor de transcripción KLF6 endógeno se une al promotor proximal de *MMP14* en células endoteliales.**

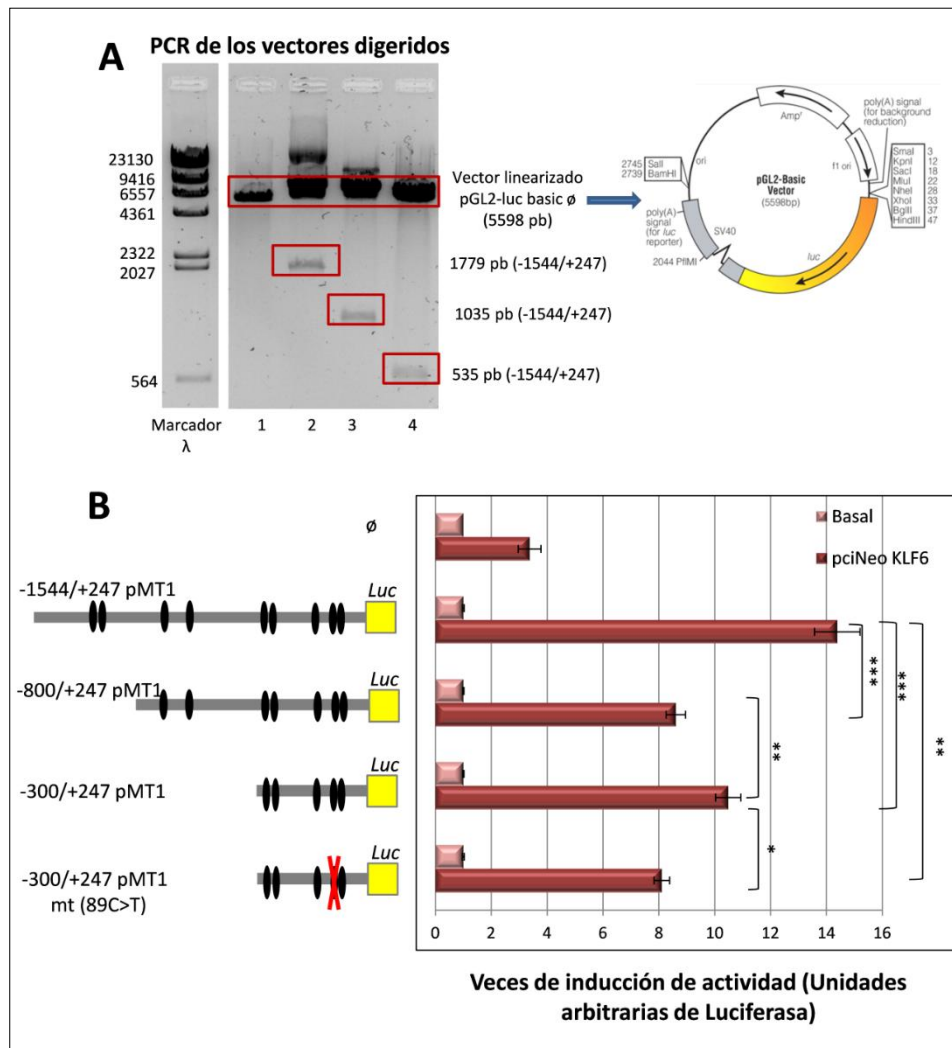
En la parte superior de la figura se muestra el esquema del promotor de *MMP14* con los sitios potenciales de unión a KLF6, identificados anteriormente mediante análisis *in silico*, donde se encuentran dominios ricos en GC. La

cromatina de las células HUVECs se digirió obteniendo fragmentos entre 150-300 pb de tamaño y se sometió a ChIP. Cada experimento de ChIP está realizado, tanto en situación control (C), como 3 horas después de realizar la herida (I). La IP se realizó con anti-KLF6, anti-H3K4 (anti-histona H3 que se utiliza como control positivo) y anticuerpo IgG irrelevante como control negativo. Las PCRs se realizaron con las parejas de cebadores que limitan cuatro regiones distintas detalladas en el esquema superior del promotor de MMP14 que contienen los sitios identificados de unión probable a KLF6, siendo estas cuatro regiones: -1142/-857 (abarca los sitios -1067 y -1048); -783/-569 (abarca los sitios -718, -635); -107/+72 (abarca los sitios -86, -65) y -7/+233 (abarca los sitios +83, +152, +185). Esta unión de KLF6 conseguida por ChIP y posterior PCR se observa en las bandas de las membranas que se muestran para cada región. Se utilizó el lisado total como "input" o lisado nuclear total sin inmunoprecipitar. La unión del factor KLF6 a la región del promotor amplificada se cuantificó mediante densitometría de las bandas obtenidas para cada condición, como se muestra en las gráficas. Se representa la relación (KLF6-IgG)/Input, normalizando la condición 3h después de la herida, frente a la condición basal (C). (\* $p < 0,05$ ).

### **1.7 KLF6 transactiva al promotor de MMP14 en células endoteliales y las variantes KLF6 de *splicing* antagonizan esta acción.**

Con el fin de estudiar el efecto funcional de KLF6 sobre el promotor de MMP14 se realizaron experimentos con diferentes construcciones reporteras de este promotor (pMT1). La co-transfección transitoria se efectuó en las células HEK293T con tres construcciones diferentes que contienen delecciones seriadas del promotor pMT1-luciferasa y por tanto un número distinto de sitios putativos de unión a KLF6 (-1544/+247; -800/+247; -300/+247). La **Figura 40A** muestra la caracterización de los vectores correspondientes basados en el reportero pGL2-luciferasa, donde los tres insertos han sido digeridos y separados mediante electroforesis para comprobar que eran correctos. Todas estas construcciones muestran una marcada activación (entre 8-14 veces) cuando se sobreexpresa KLF6 (**Figura 40B**). La estimulación más alta del promotor (14 veces), se obtuvo con la construcción del promotor más grande (-1544/+247), que contiene todos los motivos consenso de unión identificados *in silico* para KLF6. Con las otras dos construcciones se obtuvo un aumento de entre 8-10 veces respecto a la condición basal. El hecho de que la construcción de tamaño intermedio (-800/+247) sufra una estimulación algo menor que la construcción mínima (-300/+247), indicaría la existencia de un posible sitio de represión transcripcional, aunque por supuesto, no suficiente para inhibir por completo la activación del promotor bajo la estimulación de KLF6. Por otra parte, en dicha construcción mínima (-300/+247), dentro de la región que se transcribe pero no se traduce, se mutó una base en la posición +89 (G>T), con la finalidad de eliminar una zona "rica" en G y C, perteneciente a uno de los sitios teóricos de unión putativos de la secuencia promotora a KLF6, observándose que esta mutación disminuía en un 15% la activación del promotor inducida por KLF6 (**Figura 40B**). Teniendo en cuenta que esta

construcción contiene otros cuatro sitios teóricos probables de unión para KLF6, es de esperar que la mutación individual de un solo sitio en la posición +89 de MMP14 de lugar a una inhibición reducida de la actividad promotora. Estos resultados demuestran que KLF6 es capaz de interaccionar funcionalmente con el fragmento proximal del promotor de MMP14 (-1544/+247) de forma general, estimulando su actividad transcripcional.

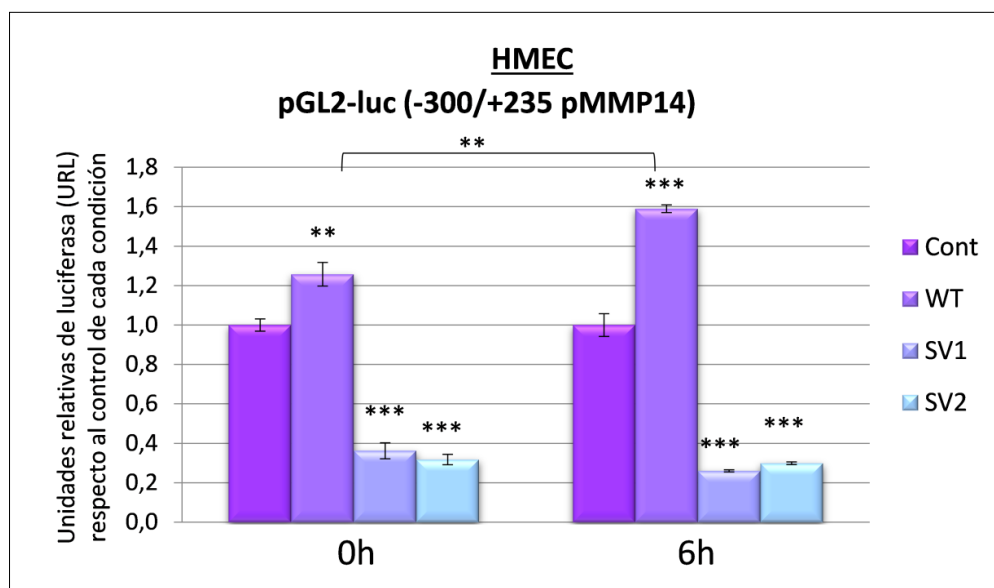


**Figura 40: KLF6 transactiva al promotor de MMP14.**

**A:** PCR de la digestión durante 1h a 37°C con las enzimas *MLuI* y *XhoI* de las construcciones preparadas por *GenScript* en el vector pGL2-Luc, cuyo esquema se muestra a la derecha. El producto de la digestión se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa. En la primera columna del gel se observan las bandas correspondientes al marcador de tamaño  $\lambda$ . El resto de columnas: 1, banda correspondiente a pGL2-luc vacío ( $\emptyset$ ); 2, 3 y 4, bandas correspondientes al vector vacío y los distintos insertos correspondientes a las secuencias del promotor de MMP14 clonadas (-1544/+247 pMT1; -800/+247 pMT1 y -300/+247 pMT1). **B:** Esquema de las diferentes construcciones generadas mediante la delección seriada en 5' del promotor de MMP14, indicando con los círculos negros la presencia de los posibles sitios de unión de KLF6. El gráfico muestra la actividad transcripcional de todas las construcciones en situación basal y tras la sobreexpresión de KLF6 (pciNeo KLF6) en HEK293T. Además, la mutación en la posición +89 de la construcción más pequeña del promotor (-300/+247) inhibe parcialmente esta activación. Todas las actividades de los promotores se representan normalizadas frente a cada una de sus condiciones basales. La sobreexpresión de KLF6 incrementa entre 8-14 veces la actividad de las distintas

construcciones del promotor MMP14. La eficiencia de transfección del vector con luciferasa se corrigió en todos los casos por la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción respecto a la actividad basal de su construcción correspondiente. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Adicionalmente se realizaron experimentos con las variantes SV1 y SV2 del factor de transcripción KLF6 producidas por *splicing* alternativo que actúan como dominantes negativos (Botella y col., 2009). Estas dos isoformas tienen una masa molecular menor que KLF6-WT y antagonizan su función. Las células endoteliales HMEC se co-transfectaron con la construcción más pequeña del promotor de MMP14 (-300/+247 pMT1-luciferasa) y KLF6-WT, SV1 o SV2 en pcDNA3.1, tanto en condiciones normales (0h) como a las 6 horas durante el cierre de herida endotelial (**Figura 41**). Este experimento demostró en otro modelo endotelial, que la activación del promotor de MMP14 por la isoforma salvaje WT, en este caso en pcDNA3.1, es inhibida por ambas variantes de KLF6, SV1 y SV2 que antagonizan su función y por tanto silencian al promotor. En definitiva, estos datos demuestran que KLF6 no es sólo un inductor, sino también un regulador a nivel transcripcional de la metaloproteínasa MMP14, que junto a otras proteínas, tienen un papel fundamental durante el proceso de cierre de herida endotelial.

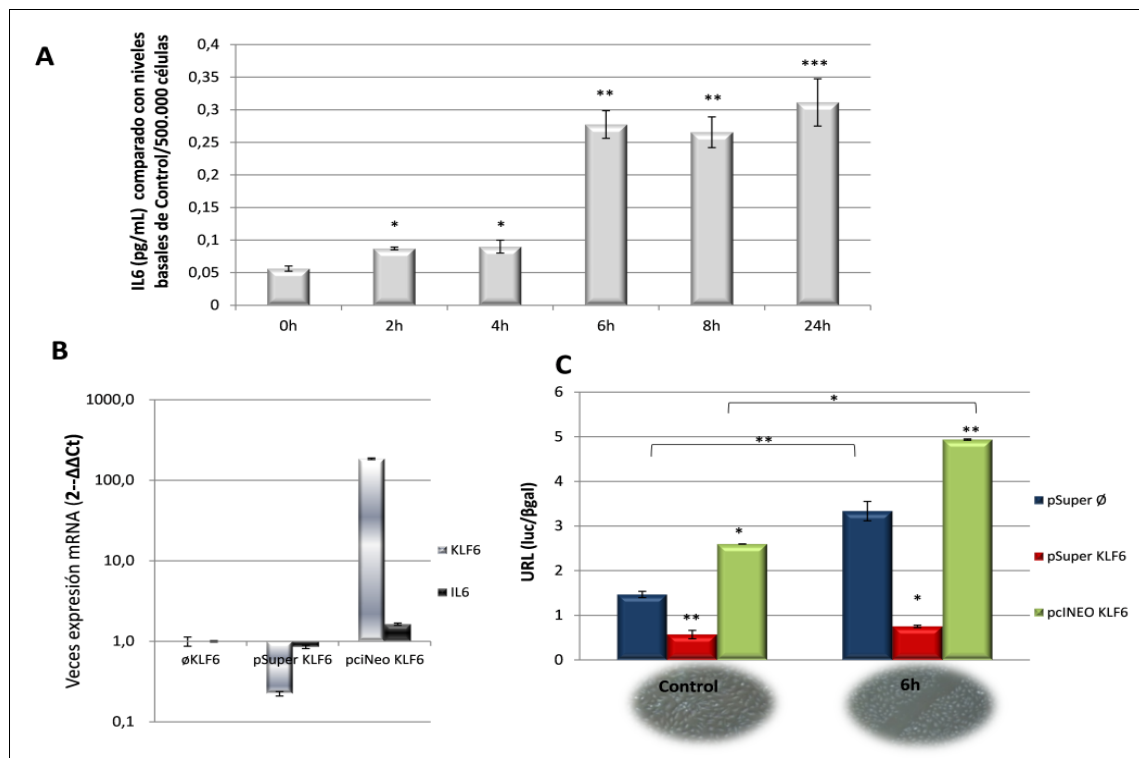


**Figura 41: Las variantes de *splicing* alternativo de KLF6 disminuyen la activación del promotor MMP14.**

Las células endoteliales HMEC se co-transfectaron con el vector pGL2-luc que contiene la construcción más pequeña del promotor de MMP14 (-300/+247 pMT1) y la variante WT de KLF6 (pcDNA3.1-FL-KLF6) que sirve como control positivo, o las variantes SV1 y SV2 de *splicing* alternativo de KLF6 en pcDNA3.1. Se observa cómo las variantes SV1 y SV2, que tienen una actividad antagónica a KLF6-WT, disminuyen la actividad del promotor MMP14. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### **1.8 KLF6 regula, además, la expresión de otros genes como IL-6 en células endoteliales.**

En lo que concierne a otros genes posiblemente regulados de forma directa o indirecta por KLF6, se identificaron mediante un estudio *in silico*, motivos consensos de unión para KLF6, ricos en GC, en el promotor de IL-6, ya descritos por Garrido-Martín y col., (2013). Además, estos autores observaron por inmunohistoquímica en arterias femorales de ratones sometidos a daño endotelial, que la inducción de IL-6 tras el daño estaba disminuida cuando se trataba del modelo animal *Klf6*<sup>+/-</sup>. En esta tesis se quiso profundizar acerca de si IL-6 se comportaba de forma similar a MMP14. Se demostró que tras el proceso de denudación o daño endotelial *in vitro*, los niveles de IL-6, a pesar de que con la confluencia celular y con el tiempo aumentaban de forma basal, se inducían observándose una cinética similar a la que ocurría con solEng (**Figura 42A**). Tras sobreexpresar o silenciar KLF6 con pcNeo-KLF6 o pSuper-KLF6, la expresión génica de *IL-6* aumentaba o disminuía, respectivamente (**Figura 42B**). Además, se comprobó que el vector reportero de IL-6, pGL3-luc-IL6, también aumentaba considerablemente su actividad cuando las HUVECs de forma basal sobreexpresaban KLF6, y más aún a las 6h tras realizar la herida. Por el contrario, cuando se silenciaba *KLF6*, se inhibía tanto la actividad basal del promotor de IL-6, como su actividad inducida a las 6 horas tras el daño endotelial (**Figura 42C**).



**Figura 42:** Los niveles de IL6 se inducen por KLF6 durante el daño endotelial siguiendo una cinética similar a la de solEng.

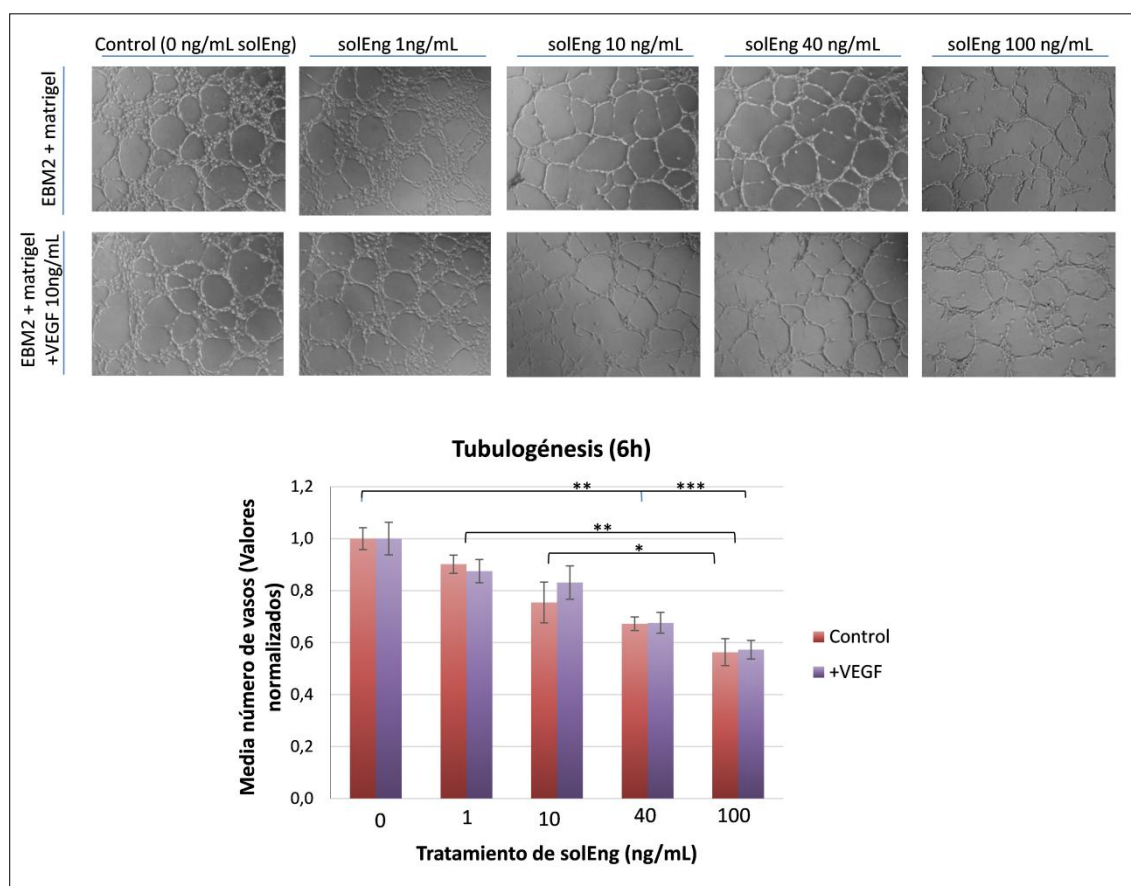
A: Los niveles de IL6 se midieron por ELISA y la concentración que se muestra en el histograma está normalizada frente a 500.000 células, restando en cada caso la concentración de IL6 de las células endoteliales sin daño. Estos niveles de IL6 aumentan cuando el cierre de herida está más activo. B: La expresión génica de IL6 aumenta o disminuye según se sobreexpresa o se silencia KLF6, respectivamente. C: Transactivación del promotor de IL6 tras nucleofectar las HUVECs con pGL3-luc-IL6 y silenciando o sobreexpresando KLF6. Se observa un incremento de actividad luciferasa cuando KLF6 está sobreexpresado y esta actividad del promotor aumenta aún más tras la herida. Sin embargo, si se silencia KLF6, disminuye la actividad del promotor y el aumento que se produce tras la herida se inhibe completamente. (\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; respecto a la condición de 0h).

## 2. Efecto de la endoglina soluble (solEng) sobre proteínas y genes implicados en angiogénesis.

Hasta ahora se conoce muy poco sobre qué proteínas y rutas de señalización pueden verse afectadas ante determinados procesos en los que se produce un aumento de solEng en el medio. En este apartado se analiza qué genes y proteínas son regulados por solEng, con el fin de entender lo que ocurre en procesos como la angiogénesis y vasculogénesis.

### 2.1 Altos niveles de solEng reducen la formación de tubos y disminuyen la migración endotelial y la angiogénesis.

Aunque ya hay evidencias previas que describen que la solEng tiene una función antiangiogénica (Castonguay y col., 2011; Hawinkels y col., 2010), se quiso analizar esta función *in vitro* en nuestro modelo de células endoteliales HUVECs en ensayos de tubulogénesis o formación de vasos. Para ello se ensayaron tanto concentraciones bajas como aquellas consideradas patológicas, entre 40-60 ng/mL, las cuales se han encontrado en embarazadas con preeclampsia. Como se ha detallado en la sección de Materiales y Métodos, el estudio de angiogénesis *in vitro*, consiste en sembrar las células sobre una matriz de Matrigel, que contiene los componentes necesarios presentes en la matriz extracelular para que se formen estructuras tridimensionales similares a tubos. En la **Figura 43** se muestra la formación de tubos, a las 6h de sembrar las células, con tratamientos crecientes de solEng y suplementando, o no, el medio con VEGF, que favorece la angiogénesis. Nuestros resultados indican que no existen diferencias significativas en la formación de la red tubular a las dosis de 1ng/mL y 10ng/mL de solEng, con o sin VEGF, si se compara con las HUVECs control. Sin embargo, al aumentar la concentración de solEng a 40 ng/mL y 100 ng/mL, sí que se observa un efecto inhibitorio significativo, disminuyendo por tanto, la cantidad de estructuras tubulares completamente cerradas que son capaces de formar las células endoteliales, lo cual indica un efecto represor de la actividad angiogénica.

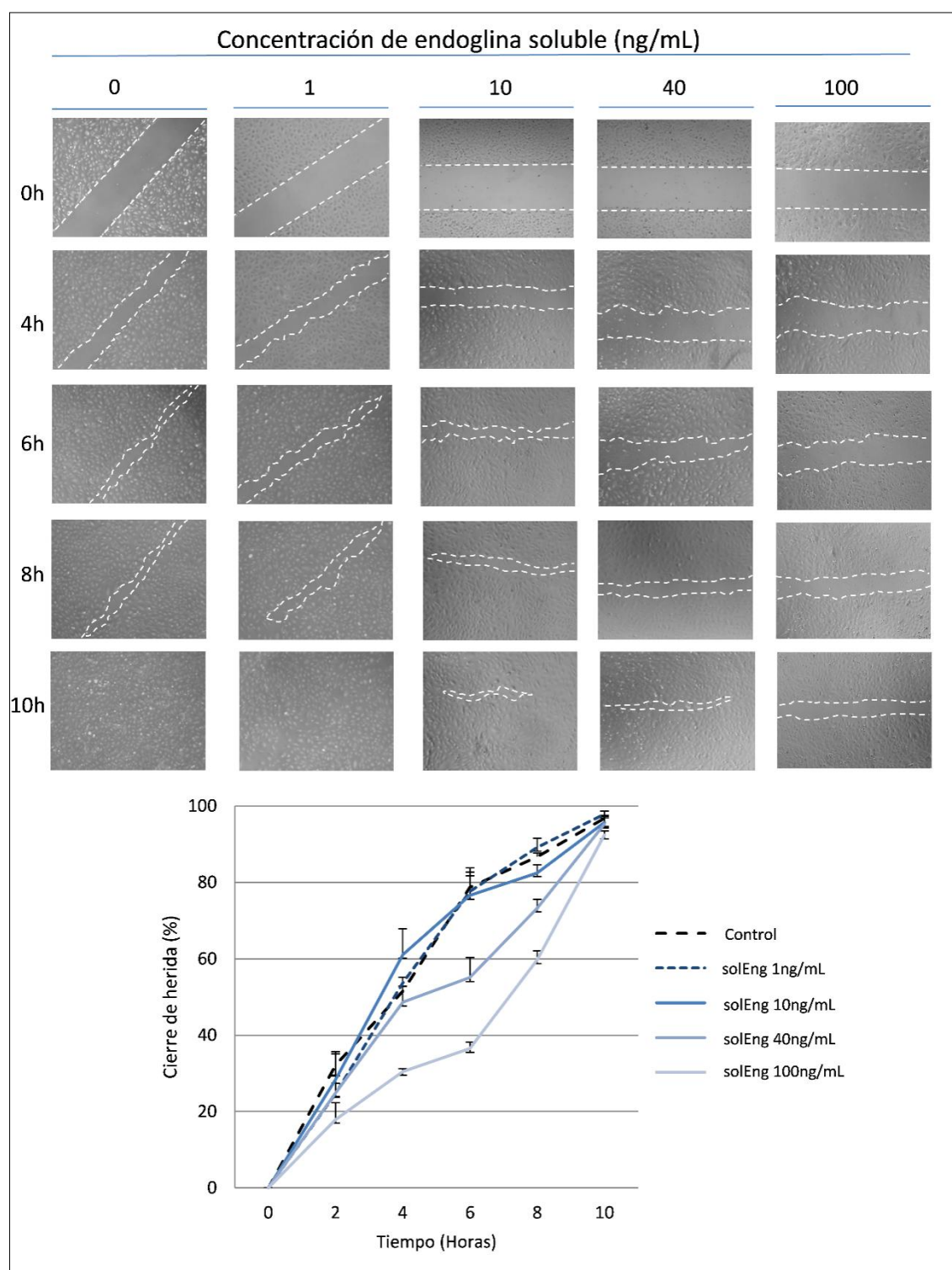


**Figura 43: Inhibición de formación de tubos por el tratamiento con solEng.**

Se sembraron las HUVECs sobre matrigel, se incubaron durante 6 horas con concentraciones crecientes de solEng, con o sin VEGF, y se tomaron fotografías bajo el microscopio óptico. Se observó que el número de tubos cerrados disminuyó según se incrementó la concentración de solEng. La gráfica muestra los valores normalizados respecto al control. Se representa la media del conteo en 4 zonas elegidas al azar dentro del mismo pocillo correspondientes a 3 experimentos de cada condición. Se pueden ver diferencias estadísticamente significativas entre algunas condiciones (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

A continuación se realizaron experimentos de migración mediante la medición del cierre de herida endotelial a distintos tiempos, y se comprobó que la solEng tiene un efecto antimigratorio, haciendo que la migración se ralentice cuando las células endoteliales se tratan con concentraciones de 40 y 100ng/mL de solEng (**Figura 44**). En condiciones normales, sin tratamiento, la herida está prácticamente cerrada entre 6 y 8h (75% y 90%, respectivamente) y sin embargo con altas concentraciones de solEng (100ng/mL) el daño endotelial está cerrado sólo en un 35% a las 6h y en un 60% a las 8h.





**Figura 44: La solEng inhibe la migración de células HUVECs.**

Se trataron las células con concentraciones crecientes de solEng tras realizar una herida con una punta de pipeta a la monocapa de células endoteliales. A distintos tiempos se tomaron fotografías bajo el microscopio óptico y se midió, mediante el programa de ImageJ, la distancia de cierre, tomando como punto inicial las 0h (0% de cierre) como se muestra en la gráfica. Tanto en la gráfica, como visualmente en las fotografías, se observa una inhibición en la migración endotelial como consecuencia del tratamiento con solEng.

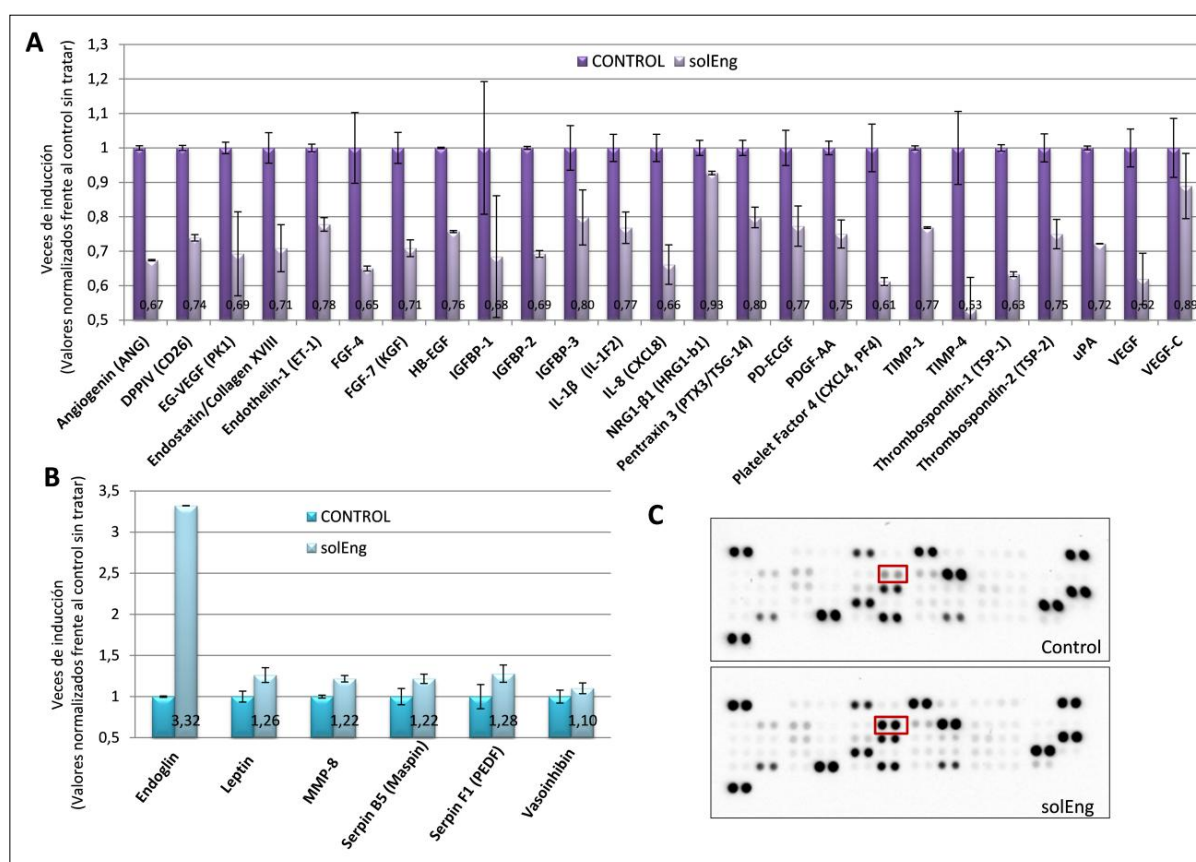
Estos resultados demuestran que solEng no sólo inhibe la tubulogénesis, sino también la migración celular. Igualmente se realizaron experimentos de lapso de tiempo en microscopía confocal, realizando una foto cada 30 segundos durante 8 horas, periodo que dura el cierre de la herida en nuestro modelo experimental endotelial. Se compararon los vídeos montados a partir de estas fotografías entre HUVECs control y HUVECs tratadas con 100ng/mL de solEng, observándose que solEng inhibía el cierre de herida en determinados momentos centrales entre las 4 y 6h (datos no mostrados).

## **2.2 La solEng afecta a la expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis en HUVECs.**

Para intentar comprender los mecanismos moleculares de esta función antiangiogénica de solEng que observamos en nuestro modelo de HUVECs intentar dilucidar qué proteínas pueden verse modificadas tras el tratamiento con solEng, se realizaron dos tipos de experimentos con las proteínas secretadas al medio: i) un *array* de angiogénesis; y ii) un iTRAQ.

El *array* de angiogénesis, usado para el análisis de los sobrenadantes de HUVECs dio información acerca de las proteínas que se encontraban sobreexpresadas o inhibidas tras el tratamiento con solEng, comparándolas con células HUVECs control (**Figura 45**). Es importante destacar que tanto la inhibición (encontrada en 25 proteínas de 56 analizadas) como la sobreexpresión (hallada en 6 proteínas de 56 analizadas) que se produce tras el tratamiento con solEng no supera el 25-40% respecto a las células control. Entre algunas de las proteínas que disminuyen más de un 25% con el tratamiento de solEng (**Figura 45A**) están: la angiogenina, proteína clave en el proceso de angiogénesis normal y tumoral así como en migración y proteólisis de la matriz extracelular; DPPIV o dipeptidil-peptidasa 4 (CD26) asociada con la regulación inmune, apoptosis y supresión tumoral; EG-VEGF (*Endocrine Gland-Derived Vascular Endotelial Growth Factor*), importante en procesos de angiogénesis y patologías de placenta; Endostatina, proteína implicada en la preeclampsia más grave y con efecto antiangiogénico; FGF-4 y FGF-7 (*Fibroblast Growth Factor 4 y 7*), involucradas en reparación tisular, crecimiento tumoral e invasión; IGFBP-2 (*Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2*), implicada en migración, adhesión celular, crecimiento y desarrollo; IL-8, interleuquina involucrada en la respuesta inflamatoria y regulación de proteínas de adhesión; PF4 (*Platelet Factor 4*), proteína importante en inflamación y

reparación de heridas; TIMP-4 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 4*), inhibidor de metaloproteasas con una importante función reguladora en el remodelado del endometrio; TSP-1 (*Thrombospondin 1*), ligada a la tumorigénesis, angiogénesis y agregación de plaquetas; uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) relacionada con la activación de plasminógeno y fibrinólisis, regulada por PAI-1 y perteneciente a la ruta de señalización de TGF- $\beta$ ; y VEGF, factor por excelencia estimulante de angiogénesis y vasculogénesis. Entre las proteínas que están aumentadas en más de un 25% con el tratamiento de solEng (**Figura 45B**) se pueden destacar: Leptina, que no sólo actúa regulando el apetito y la adipogénesis, sino también en procesos de angiogénesis e inmunidad relacionada con la inflamación; y PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), potente inhibidor de la angiogénesis. Como cabía esperar, también están aumentados los niveles de endoglina, dado que se añade solEng exógena para realizar el tratamiento. El aumento o disminución de estas proteínas tras el tratamiento con solEng son compatibles con los efectos antiangiogénico y antimigratorio de solEng descritos en el apartado anterior.

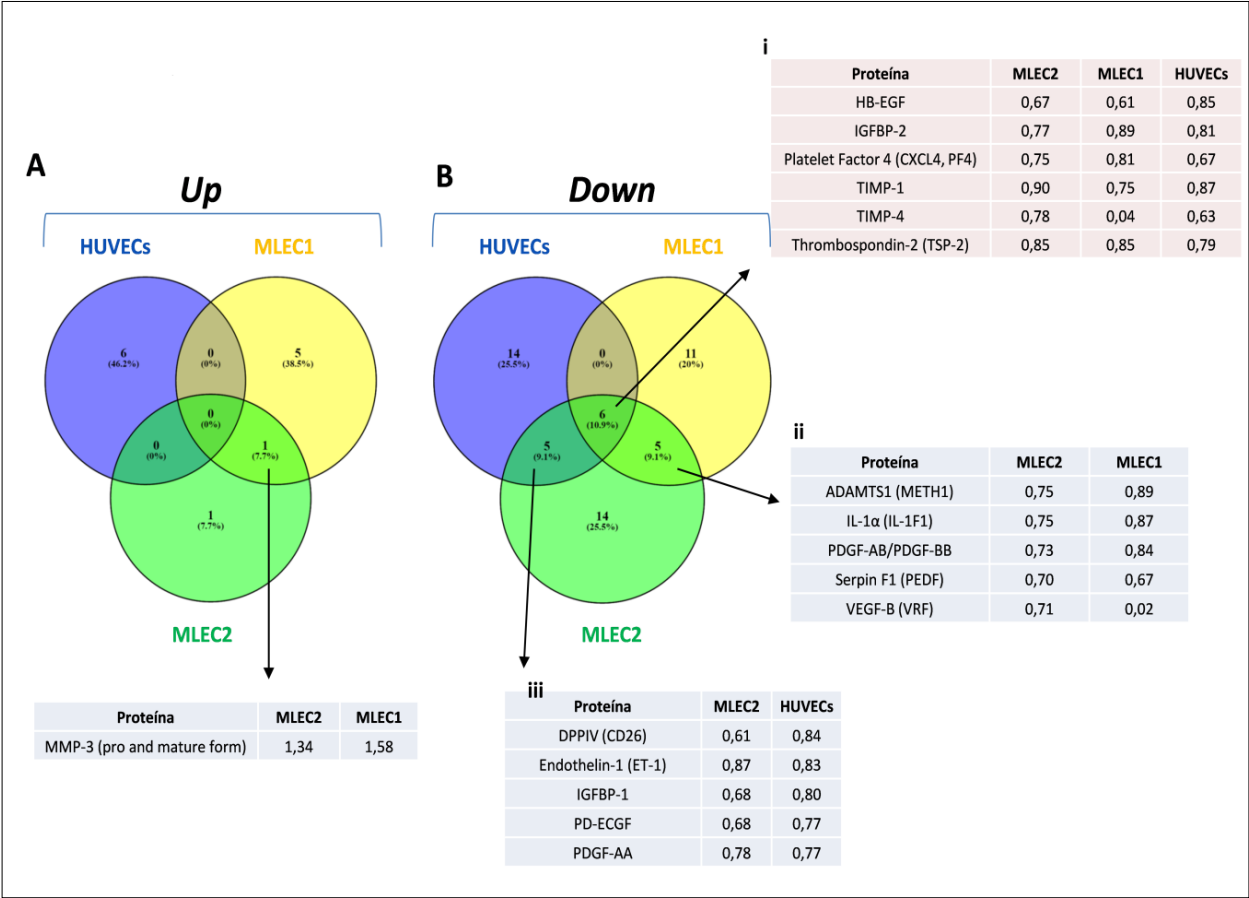


**Figura 45 (Página anterior):** Análisis de los niveles de proteínas secretadas tras el tratamiento de células endoteliales con solEng.

Las HUVECs fueron tratadas en ausencia o presencia de 100ng/mL solEng durante 24h y las proteínas angiogénicas secretadas al medio se analizaron mediante un *array* angiogénico o kit de captura con anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de nitrocelulosa. **A y B:** Cuantificación media de las intensidades de cada punto. Valores normalizados frente a cantidad de proteína del sobrenadante y frente al control sin tratar. En el panel **A** se muestran las proteínas disminuidas y en el panel **B** las aumentadas. **C:** Dos membranas representativas, tanto de células control, como tratadas con solEng 100ng/mL. Los dos puntos dentro del cuadrado rojo representan endoglina. Los experimentos de los *arrays* se realizaron por duplicado.

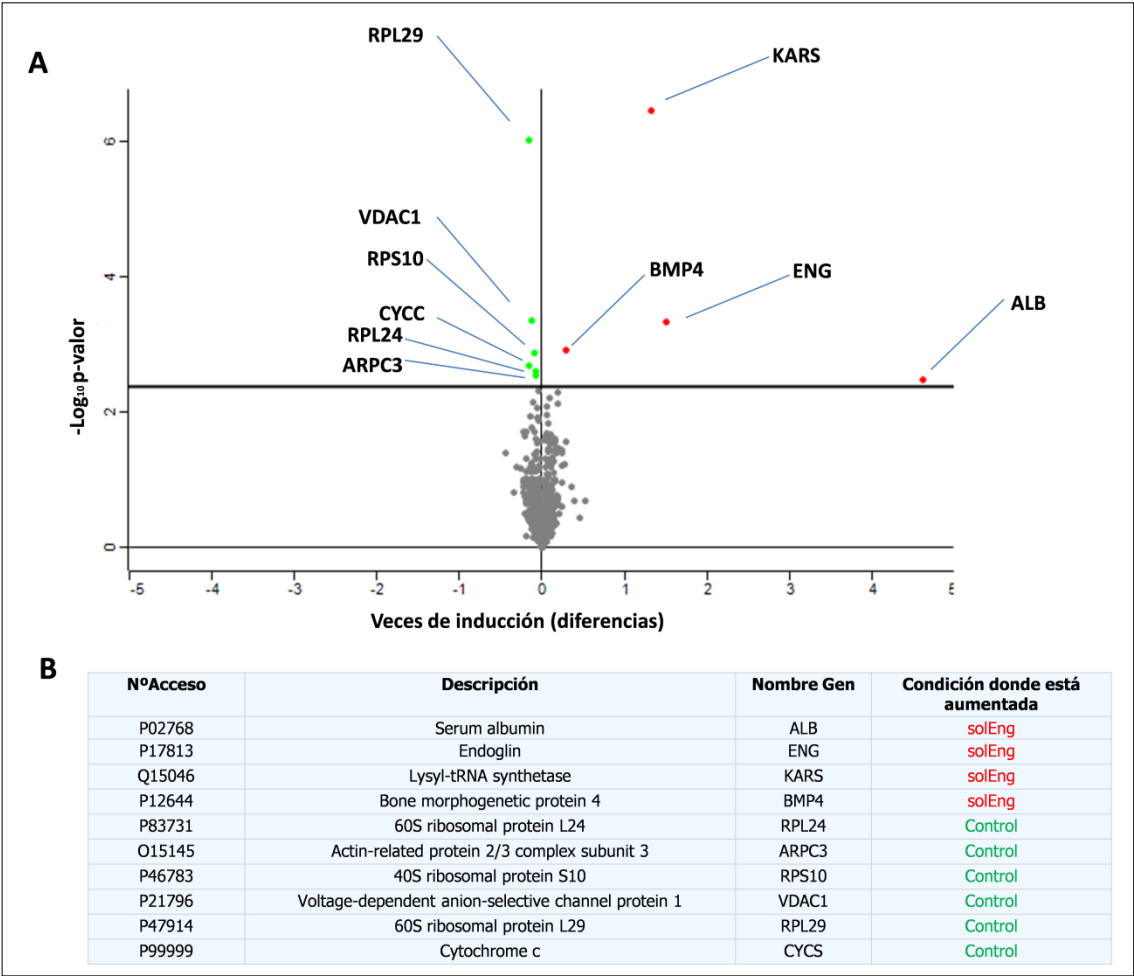
Para complementar estos resultados sobre células humanas endoteliales, se realizó, durante mi estancia en Newcastle, este mismo experimento de análisis de proteínas angiogénicas con un cultivo primario de células endoteliales extraídas de pulmón de ratón *Engfl/fl VeCre* (MLEC1), y con una línea celular inmortalizada de células endoteliales de pulmón de ratón *Engfl/fl RosaCre ERT/Immortal* (MLEC2). La finalidad de estos experimentos fue comprobar si tras el tratamiento con solEng había proteínas que se repetían en ambos modelos (humano y murino) y si éstas seguían la misma tendencia. Los resultados de estos modelos endoteliales murinos donde se observaron diferencias en los niveles de proteínas (+/- solEng) se muestran en los **Anexos 2 y 3**. Una comparación conjunta incluyendo los datos murinos (MLEC1 y MLEC2) y humanos (HUVECs) y que ilustra aquellas proteínas que se han visto aumentadas o disminuidas tras el tratamiento con solEng se muestra en la **Figura 46**. Comparando las proteínas aumentadas tras el tratamiento, sólo se pudo identificar una proteína común entre los dos tipos de células endoteliales de pulmón de ratón, MMP3 (*Matrix metalloproteinase 3*), que aumentaba en presencia de solEng, aunque no estaba aumentada en HUVECs (**Figura 46A**). Por otra parte, entre las proteínas que disminuían tras el tratamiento con solEng se encontraron 6 proteínas comunes en los 3 tipos celulares (**Figura 46B, i**), entre las que se incluyen: los factores de crecimiento HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-like growth factor*) e IGFBP-2 (*Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2*); la quimioquina CXCL-4 (*Chemokine C-X-C motif ligand 4*) que está muy implicada en cierre de heridas; la proteína antiangiogénica TSP-2 (*Thrombospondin 2*); y los inhibidores TIMP-1 y 4 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 y 4*) que pueden modular la actividad de varias metaloproteasas implicadas en angiogénesis. Cabe destacar que TIMP-4 disminuye en ambos modelos endoteliales, humano y ratón, en más de un 25% de diferencia con respecto a las células control sin tratar. Además, hay otras 10 proteínas cuyos niveles, en presencia de SolEng, disminuyen en dos de los tres tipos de células endoteliales estudiadas (**Figura 46B, ii y iii**). Así, por

ejemplo, las proteínas ADAMTS1 (*A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 1*), IL-1 $\alpha$ , PDGF-AB/PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor*), Serpin F1, y VEGF-B están disminuidas en los dos tipos de células endoteliales de ratón (**Figura 46B, ii**), mientras que las proteínas DPPIV, Endothelin-1, IGFBP-1, PD-ECGF y PDGF-AA están disminuidas en la línea de ratón MLEC2 y en HUVECs (**Figura 46B, iii**). Es de resaltar que la mayoría de estas proteínas muestran una actividad pro-angiogénica, lo que concuerda con el efecto anti-antiangiogénico de solEng.



**Figura 46: Diagramas de Venn comparando las proteínas angiogénicas aumentadas o disminuidas en presencia de solEng.**  
Se comparan las proteínas secretadas tras el tratamiento con solEng, en tres tipos celulares endoteliales diferentes de humano y ratón (HUVECs, MLEC1 y MLEC2), y cuyos niveles muestran más de un 10% de diferencia con respecto a las células control sin tratar. **A:** Proteínas aumentadas en los tres tipos celulares después del tratamiento con solEng. Se destaca una proteína común entre MLEC1 y MLEC2. **B:** Proteínas disminuidas en los tres tipos celulares después del tratamiento con solEng; **i**, proteínas disminuidas comunes entre HUVECs, MLEC1 y MLEC2; **ii**, proteínas disminuidas comunes entre MLEC1 y MLEC2; **iii**, proteínas disminuidas comunes entre HUVECs y MLEC2.

A continuación se abordó el objetivo de análisis proteico usando una aproximación experimental con la metodología iTRAQ. En concreto, se analizó de una manera más general pero cuantitativa el efecto de solEng sobre las células HUVECs, ya no sólo centrándonos en las proteínas angiogénicas, sino analizando todo el secretoma. Este experimento se llevó a cabo siguiendo el protocolo ya descrito en la sección de Materiales y Métodos de marcaje de péptidos, espectrometría de masas/masas, identificación y cuantificación de péptidos y proteínas, y posterior análisis estadístico. Este proceso permitió diferenciar aquellos péptidos (y por ende, proteínas a las que corresponden dichos péptidos) cuyos niveles estaban alterados en presencia de solEng. De las 1301 proteínas identificadas en el secretoma se cuantificaron 730 (**Anexo 8**). Aunque el número de proteínas totales encontradas en el sobrenadante era alto y algunas de ellas además de mostrar diferencias respecto al control, se habían detectado anteriormente con el panel angiogénico, sólo había diferencias estadísticamente significativas en 9 de ellas. Estas 9 proteínas se escogieron porque difieren del control en una ratio  $>1,5$  o  $<0,67$  y además contaban con una diferencia estadísticamente significativa muy fiable ( $p < 0,005$ ). Es importante destacar que la solEng comercial utilizada lleva como portador albúmina bovina (BSA). Esto provocó un aumento en los valores de fondo a la hora de cuantificar los péptidos, de tal manera que solo se detectaron como significativas, proteínas muy desreguladas entre las dos condiciones a comparar. A pesar de ello, muchas otras proteínas aparecen desreguladas (considerando incrementos en la ratio de  $>1,5$  y  $<0,67$ ) entre las dos condiciones, aunque no significativamente. Tanto en la tabla como en la representación gráfica tipo volcán (*Volcano plot*) de la **Figura 47** se muestran las 9 proteínas identificadas con diferencias estadísticamente significativas que aumentan o disminuyen después del tratamiento con solEng. Como era de esperar, tanto endoglina como albumina humana (que tras realizar un *Blast* de las secuencias entre Albúmina humana y bovina, tienen una identidad del 77%), añadidas de forma exógena, están aumentadas. Respecto al control, se destacan las proteínas aumentadas KARS (*Lysyl-tRNA synthetase*) y BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), así como las proteínas disminuidas RLP24 (*60S ribosomal protein L24*), ARPC3 (*Actin-related protein 2/3 complex subunit 3*), RPS10 (*40S ribosomalprotein S10*), VDAC1 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*), y CYCS (*Cytochrome c*). Cabe señalar que BMP4 es un ligando de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ , en la que endoglina actúa como receptor auxiliar. Por este motivo, centramos el siguiente apartado de experimentos en estudios de BMP4



**Figura 47: Identificación por iTRAQ de las proteínas diferencialmente secretadas por HUVECs en presencia de solEng.**

**A:** Gráfica tipo volcán donde se representan las proteínas que cambian significativamente respecto al control. El eje horizontal representa las veces de inducción de la ratio (HUVECs tratadas con solEng / HUVECs control), considerando menores diferencias si los valores están más cercanos a 0. En el eje vertical se representa el  $-\text{Log}_{10}(\text{p-valor})$ , siendo la línea continua horizontal trazada en el valor de 2,4, equivalente a un p-valor de 0,005. La nube de puntos grises centrales representa las proteínas cuantificadas pero no estadísticamente significativas. Las proteínas inhibidas o sobreexpresadas y con diferencias estadísticamente significativas tras el tratamiento con solEng se representaron en verde o rojo, respectivamente. **B:** Tabla donde se detallan las proteínas representadas en el gráfico en las que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, incluyendo el correspondiente número de acceso en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

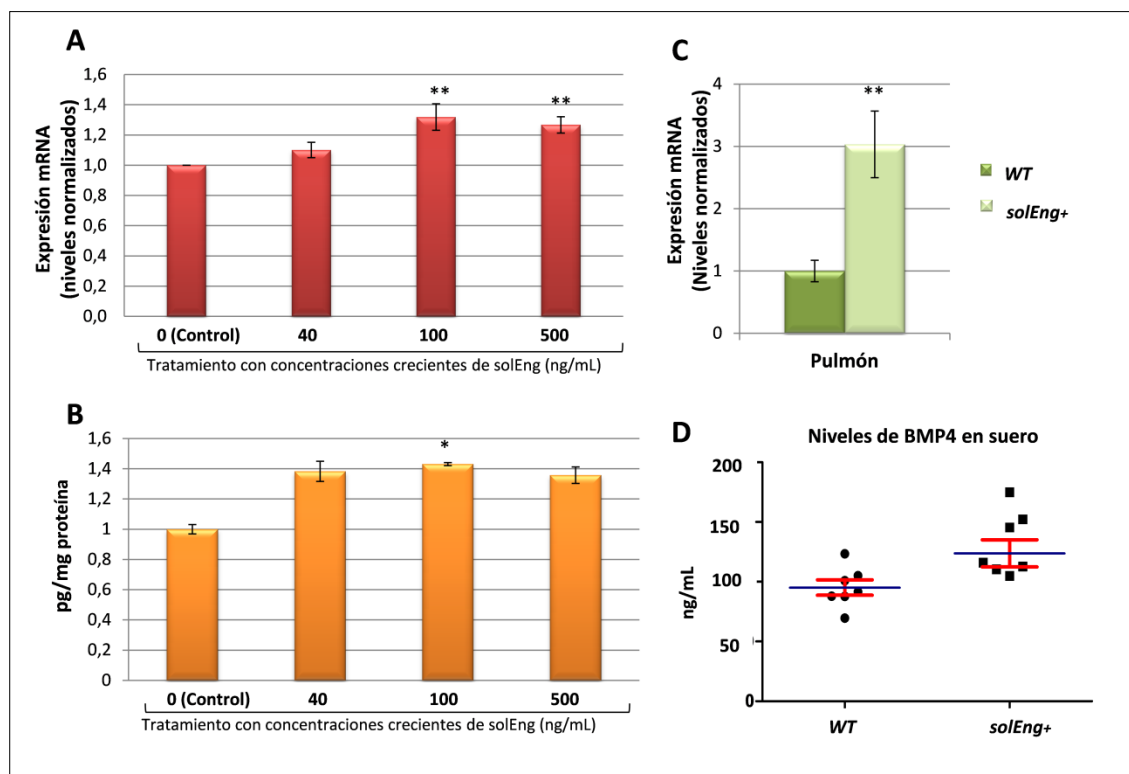


### **2.3. La solEng aumenta los niveles de BMP4**

El análisis proteómico cuantitativo realizado mediante iTRAQ y espectrometría de masas indicaba que solEng aumentaba los niveles de BMP4, un miembro de la familia del TGF- $\beta$  que no sólo actúa sobre la diferenciación, regulación y generación ósea (Wu y col., 2016), sino también sobre la hematopoyesis modulando la ruta de señalización de TGF- $\beta$  (Borges y col., 2012). Se ha descrito, además, que la expresión de BMP4 aumenta en condiciones de hipoxia, vía de activación del factor de transcripción HIF-1, promoviendo hipertensión pulmonar crónica (Gu y col., 2015; Wang y col., 2015), patología relacionada con la hipertensión arterial descrita en mujeres con preeclampsia y en modelos animales, donde hay altos niveles de solEng (Venkatesha y col., 2006; Valbuena-Díez y col., 2012). Por estas razones se efectuaron experimentos adicionales para validar si la expresión de BMP4 en presencia de solEng, tanto a nivel proteico como de mRNA, mostraba un comportamiento análogo al observado con MS/MS. Se realizaron dos aproximaciones experimentales, una *in vitro* con HUVECs y otra *in vivo* en ratones modificados genéticamente que sobreexpresan una forma soluble de endoglina humana (*solEng*<sup>+</sup>). En cuanto a los experimentos *in vitro*, las HUVECs se trataron con concentraciones crecientes de solEng y tanto los niveles de BMP4 secretados al medio, como sus niveles de mRNA, fueron analizados mediante un kit de ELISA y qRT-PCR respectivamente (**Figura 48 A y B**). Se observó que los niveles de proteína (**Figura 48A**) y los de mRNA (**Figura 48B**) de BMP4 aumentaron según se incrementaba la concentración de solEng, confirmando los resultados obtenidos mediante iTRAQ y espectrometría de masas. A continuación se analizó la expresión del mRNA de BMP4 en diferentes tejidos de ratones transgénicos que sobreexpresan solEng. Se encontró que los niveles de transcritos de BMP4 son más elevados en el pulmón (**Figura 48C**), estómago o duodeno (datos no mostrados) de ratones *solEng*<sup>+</sup> que en los de los ratones control. Además, mediante inmunohistoquímica de cortes de tejido de ratones *solEng*<sup>+</sup>, se pudo demostrar la presencia de la proteína BMP4 en el endotelio del pulmón, aunque sin grandes diferencias, ya que BMP4 se encuentra sobre todo en forma soluble (datos no mostrados). Se ha resaltado la expresión en pulmón por ser un órgano clave en la hipertensión pulmonar y estar altamente vascularizado, donde los efectos funcionales sobre las células endoteliales pueden ser críticos. Asimismo, se analizó la expresión de la proteína BMP4 en estos ratones con elevada solEng en sangre, obteniéndose un aumento de los niveles de BMP4 en plasma (**Figura 48D**). Estos resultados sugieren que BMP4 podría ser una proteína importante en la activación de



rutas de señalización inducidas por solEng, las cuales podrían modular los procesos de hipertensión y angiogénesis activa.

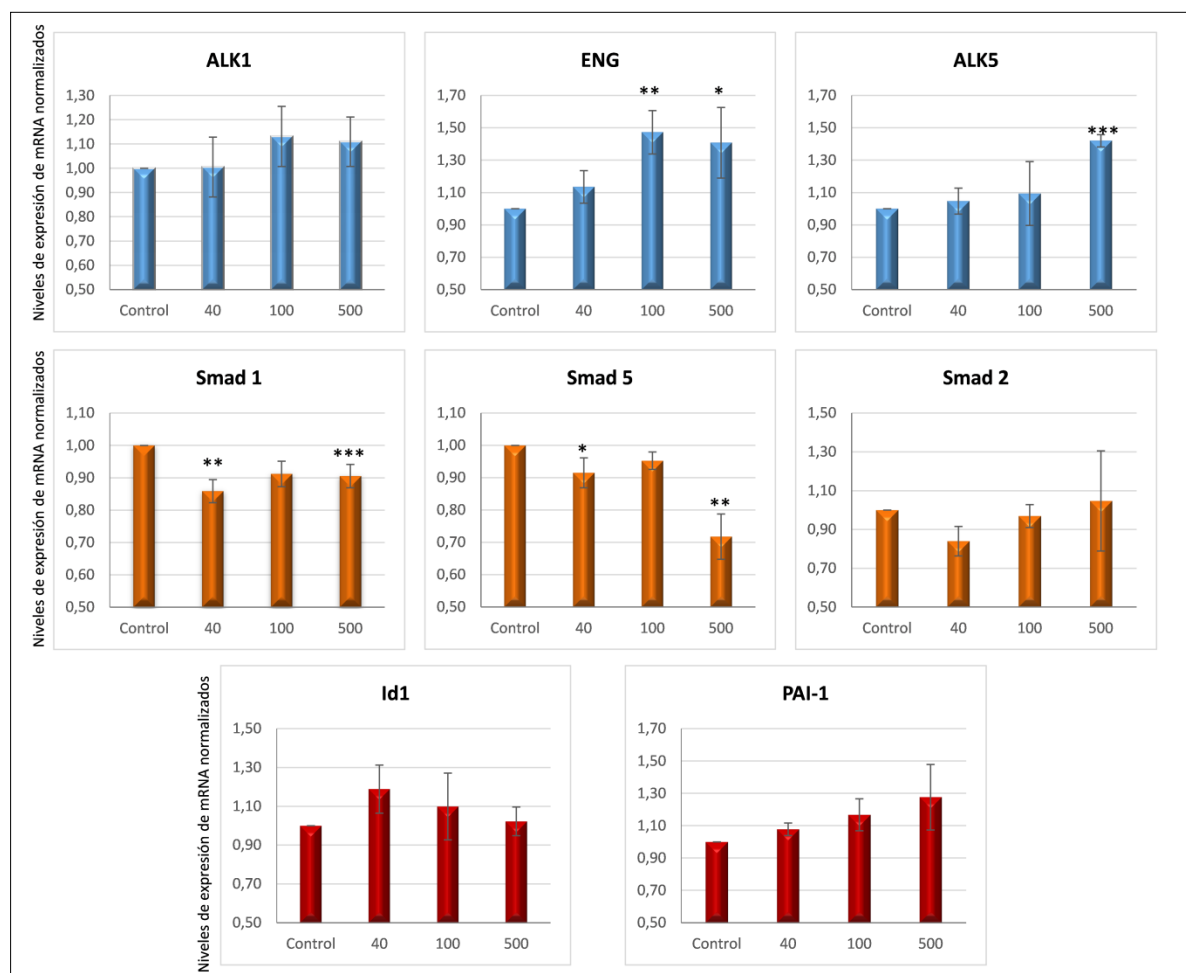


**Figura 48: Expresión de BMP4 en respuesta al tratamiento con solEng *in vitro* e *in vivo*.**

**A:** Niveles de expresión génica de BMP4 en HUVECs tratadas con concentraciones crecientes de solEng. Los valores han sido normalizados frente a la condición control o HUVECs sin tratar. Se observa un aumento de los niveles de mRNA de BMP4 de alrededor de 35% respecto a su control. **B:** Niveles de proteína BMP4 secretados al medio tras tratar las HUVECs con solEng. Los valores han sido normalizados frente al control. Se observa nuevamente la correlación entre la concentración de solEng y el incremento en los niveles proteicos de BMP4. **C:** Niveles de mRNA de BMP4 en tejido de pulmón comparando ratones transgénicos que sobreexpresan solEng (*SolEng*<sup>+</sup>) con ratones de genotipo salvaje C57BL/6 (*WT*). **D:** Niveles de BMP4 medidos en plasma de ratones transgénicos que sobreexpresan solEng (*SolEng*<sup>+</sup>) y ratones de genotipo salvaje C57BL/6 (*WT*). Se confirma así que el aumento de BMP4 como consecuencia de altos niveles de solEng, también se observa *in vivo*. (\**p*<0,05; \*\**p*<0,01 respecto a la condición control sin tratar o *WT*).

## **2.4 La solEng actúa sobre la ruta de señalización de TGF- $\beta$ y otros genes o proteínas relacionados con la angiogénesis y procesos inflamatorios.**

Hasta el momento poco hay descrito acerca de la acción de solEng sobre la ruta de señalización de TGF- $\beta$  y de los mecanismos de su actividad antiangiogénica. En esta parte de la tesis se ha tratado de dilucidar el efecto a nivel génico de solEng sobre la ruta de señalización de TGF- $\beta$ , así como sobre otros genes y proteínas implicados en procesos angiogénicos. En la **Figura 49** se muestran los niveles de mRNA de varios componentes de la vía de señalización de TGF- $\beta$ . La solEng induce un aumento estadísticamente significativo de la expresión de ALK5 y endoglin a las dosis más elevadas, no afectando a los niveles de ALK1. Igualmente se observa una tendencia a incrementar los niveles de PAI-1. Por el contrario, solEng disminuye la expresión de Smad-1 y Smad-5 de forma estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que solEng es capaz de modular la ruta de señalización del TGF- $\beta$ , inclinando la balanza a favor de la vía endoglin/ALK5, en detrimento de la vía endoglin/ALK1. Como consecuencia, se produciría una inhibición de los procesos de migración celular, angiogénesis y tubulogénesis, lo que está de acuerdo con el papel antiangiogénico descrito para solEng.

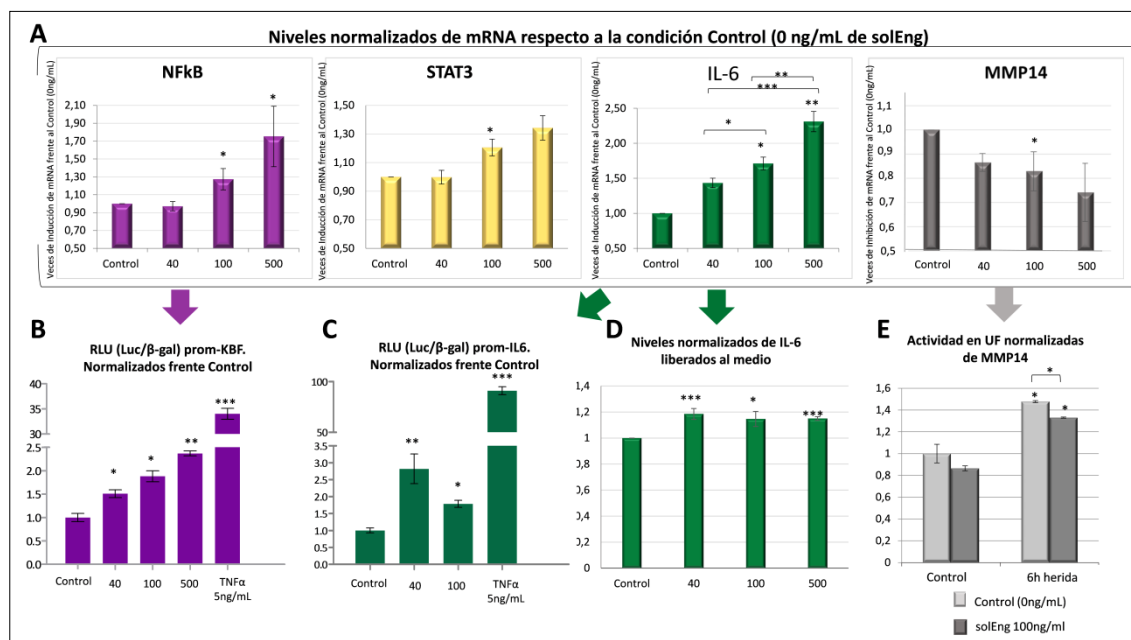


**Figura 49: Efecto de solEng sobre los niveles de mRNA de componentes de la ruta de señalización de TGF-β en HUVECs.**

Niveles de expresión de distintos mRNA de HUVECs tratadas con concentraciones crecientes de solEng (marcadas en el eje horizontal de los gráficos: 0 o Control, 40, 100 y 500 ng/mL). Los valores están normalizados frente a la condición control (HUVECs sin tratamiento). Mientras que la expresión de mRNA de ALK1 no se modifica significativamente, los niveles del mRNA de endoglin (Eng) y ALK5 aumentan de forma dependiente de la concentración de solEng. En cuanto a la familia Smad, solEng inhibe los niveles de transcritos de Smad-1 y Smad-5, sin tener efecto sobre Smad-2. La expresión de los genes diana de ALK1 y ALK5, Id1 y PAI-1, no parecen estar afectados de forma estadísticamente significativa por solEng, pero sí se aprecia una cierta tendencia a un aumento de la expresión génica de PAI-1. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a la condición control).

También se analizó el efecto de solEng sobre otros genes que codifican proteínas importantes durante el proceso migratorio y angiogénesis, incluyendo MMP14 e IL-6, que se muestran aumentadas como consecuencia de la activación de la migración durante el cierre de herida endotelial, ya descrito anteriormente en la primera sección de resultados. IL-6 es, además, una interleuquina considerada proinflamatoria cuyos niveles aumentan, como ocurre con solEng, en determinadas enfermedades inflamatorias. Los experimentos detallados a continuación se centran en el estudio de la ruta de señalización de IL-6, analizando el efecto de altas concentraciones de solEng sobre los factores de transcripción conocidos como primarios o de acción rápida como son STAT3 y NFκB (Wang-Ying y col., 2016). La **Figura 50A** muestra que la transcripción génica de NFκB, STAT3 e IL-6 aumenta de forma dependiente de la concentración de solEng, al menos durante las 24 horas que dura el tratamiento y tiene, por tanto un efecto inflamatorio. Por el contrario, solEng parece tener un efecto inhibitorio sobre la expresión génica de MMP14, lo que sugiere un efecto de retroalimentación negativa, ya que MMP14 es capaz de generar solEng. Posteriormente, se realizaron ensayos funcionales de estos genes. Las células HEK293T se transfectaron, bien con el vector reportero del promotor de IL-6, pGL3-Luc-IL6, o bien con el vector-promotor con luciferasa pGL2-luc-KBF, que tiene 3 sitios de unión al factor de NFκB, incubándose después con concentraciones crecientes solEng. Las **Figuras 50B y C** muestran que la actividad de ambos reporteros aumenta en presencia de solEng, lo que sugiere que esta proteína soluble modula estas vías de señalización. Como control positivo de estos experimentos se incluyó un tratamiento con TNFα que, como cabía esperar, indujo la activación de los reporteros de ambos genes proinflamatorios, IL-6 y NFκB. Apoyando los resultados del promotor de IL-6, los niveles de IL-6 en el medio de cultivo de HUVECs tratadas con solEng estaban incrementados respecto a las células control (**Figura 50D**). Por otra parte, se quiso comprobar si la actividad funcional de la metaloproteasa MMP14 se veía inhibida por solEng. El experimento se realizó en una monocapa de HUVECs donde se indujo una herida y a las 6 horas se analizó el efecto de solEng sobre la actividad proteolítica de MMP14, usando un péptido fluorescente como sustrato de MMP-14. Tal como se señala en la **Figura 50E**, en presencia de solEng la actividad proteolítica de MMP14 disminuye en torno a un 15% respecto a la condición sin tratar y esta diferencia era estadísticamente significativa a las 6h durante el proceso de cierre de herida. Este dato sugiere que el efecto antimigratorio de solEng durante el cierre de herida, descrito en uno de los apartados anteriores, podría deberse, al menos en parte, a esta inhibición sobre una

de las metaloproteasas más importantes de la célula endotelial implicada en la degradación de la matriz extracelular



**Figura 50: La solEng activa la ruta pro-inflamatoria STAT3-IL6 y NfκB y disminuye la expresión de la metaloproteasa MMP14 durante la migración en HUVECs.**

**A:** Niveles de expresión de mRNA de los genes NfκB, STAT3, IL-6 y MMP14 en HUVECs tratadas con concentraciones crecientes de solEng. Los resultados están normalizados frente al control sin tratar. El tratamiento con solEng durante 24h aumenta la expresión de NfκB, STAT3 e IL-6 de forma estadísticamente significativa y disminuye la expresión génica de la metaloproteasa MMP14.

**B:** Análisis de la actividad reportera de NfκB. Las células HEK293 fueron transfectadas con el vector pGL2-KBF-luc, que contiene sitios de unión para el factor de transcripción NfκB, tratadas o no con solEng a distintas concentraciones durante 24h, y usando 5ng/mL TNFα como control positivo. Los resultados del ghistograma se muestran en Unidades Relativas de Luciferasa (RLU) normalizadas frente al control. Se observa un aumento significativo de más del doble de actividad del vector reportero KBF cuando las células se tratan con 100ng/mL de solEng.

**C:** Análisis de la actividad reportera del promotor de IL-6. Las células HEK293 fueron transfectadas con el vector pGL3-luc-IL6 y tratadas o no con solEng a distintas concentraciones durante 24h, usando 5ng/mL TNFα como control positivo. Los resultados del histograma se muestran en Unidades Relativas de Luciferasa (RLU) normalizadas respecto a las células control sin tratar. Se produce un aumento de la actividad del promotor de IL-6 de >2,5 veces (40ng/mL solEng) o de >1,5 veces (100ng/mL solEng).

**D:** Niveles de IL-6 liberados al medio en presencia de solEng. Las HUVECs fueron tratadas con concentraciones crecientes de solEng durante 24h y la cantidad de IL-6 en el sobrenadante fue medida usando un kit de ELISA. Se observa que la presencia de solEng aumenta la IL-6 liberada al medio en alrededor de un 10-15% respecto al control.

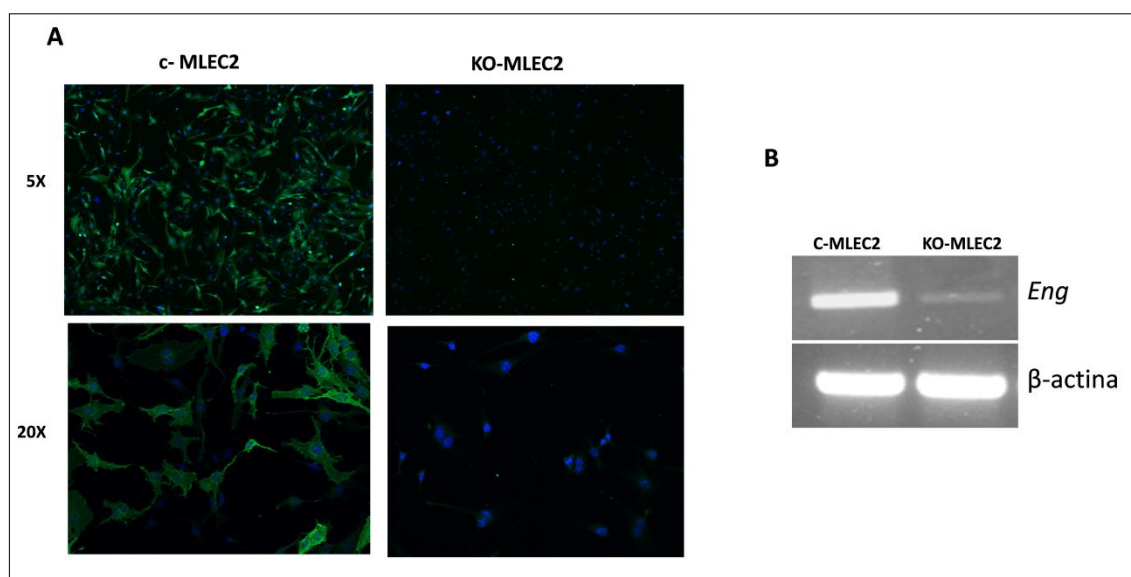
**E:** Efecto de solEng en la actividad proteolítica de MMP14. Las HUVECs en condiciones basales y tras 6 horas de producirse una herida endotelial, fueron tratadas o no con 100ng/mL solEng. La actividad de la metaloproteasa MMP14 fue medida con un sustrato fluorogénico y los resultados se representan en unidades de fluorescencia (UF). Se observa que cuando se tratan las células con solEng la expresión de MMP14 tiende a disminuir en condiciones basales y tras la herida esta inhibición se hace estadísticamente significativa, siendo de alrededor de un 15%. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0,001 respecto a la condición control sin tratamiento).

### 3. Efecto de endogлина soluble sobre las proteínas angiogénicas en células endoteliales *iKO* para *Eng* y sobre la generación de malformaciones arteriovenosas durante la neovascularización de retina en ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>* (HHT1).

En esta tercera parte de los resultados se profundiza en el efecto de la solEng tanto sobre las células endoteliales de pulmón de ratón con supresión inducible para el gen de *Eng* (MLEC2), como sobre las malformaciones arteriovenosas que se producen en un modelo animal de ratón de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1 (HHT1).

#### **3.1 Efecto de solEng sobre células endoteliales de pulmón de ratón con supresión inducible del gen *Eng* (MLEC-*iKOEng* o MLEC2).**

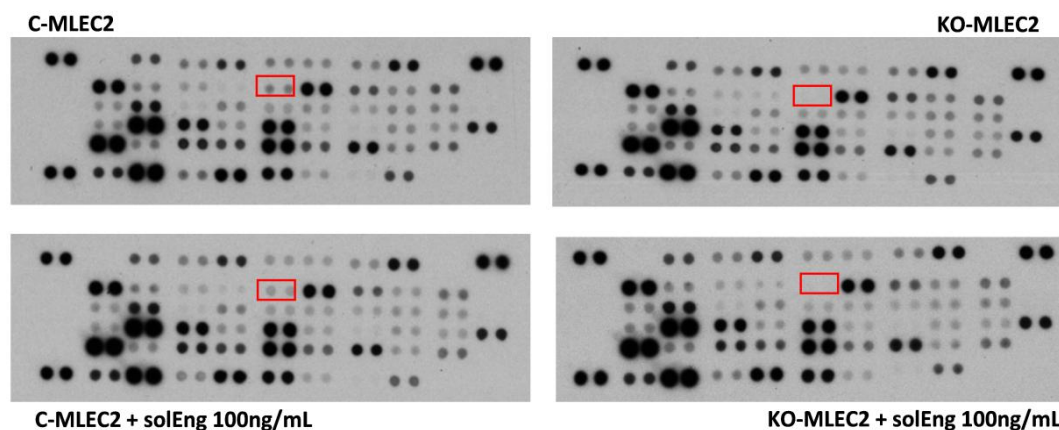
Con la finalidad de estudiar la acción de solEng sobre ratones con el genotipo HHT1, y como primera aproximación experimental, se utilizaron células endoteliales de pulmón de ratón (MLECs) inmortalizadas. Estas células provenían de un modelo murino (C57BL/6 *Eng<sup>fl/fl</sup>; RosaCre-ERT*) que presentaba el gen de *Eng* flanqueado por secuencias LoxP, (dianas de la recombinasa Cre), al que se le inducía la pérdida de los exones 5 y 6 del gen de *Eng* tras el tratamiento con OH-tamoxifeno. Para medir la eficiencia del silenciamiento génico, previamente a cualquier experimento se realizaba una PCR semicuantitativa para detectar la expresión del gen de *Eng*, así como una tinción a nivel proteico de endogлина por inmunofluorescencia. En la **Figura 51** se puede observar la supresión del gen de *Eng* y de la proteína endogлина en las células iKO-MLECs tratadas con OH-tamoxifeno (KO-MLEC2) respecto a sus controles sin tratar (c-MLEC2).



**Figura 51: Inhibición de la expresión de endoglina en células MLEC2.**

Células endoteliales de pulmón de ratón immortalizadas procedentes de un modelo murino con el alelo “floxeado” de *Eng* y con el sistema Cre-LoxP. **A:** Niveles de expresión proteica de endoglina en células iKO-Eng-MLECs (MLEC2). Se observa cómo disminuye la tinción de Eng en las células tratadas con OH-tamoxifeno (KO-MLEC2) respecto a las no tratadas (c-MLEC2). En verde (Alexa 488) se marca la expresión de Eng y en azul (DAPI) el núcleo. **B:** Niveles de expresión génica de *Eng* tras realizar una PCR, con oligos específicos para el gen de *Eng*, del DNA extraído de las células. Se comparan KO-MLEC2 y c-MLEC2. Se incluye  $\beta$ -actina como control de carga.

A continuación, se analizó el efecto de solEng sobre las proteínas angiogénicas de los sobrenadantes procedentes de los cultivos MLEC2 (c y KO) mediante “dot blots” proteicos específicos para muestras murinas que incluyen hasta 53 proteínas diferentes. Se trataron tanto c-MLEC2 como KO-MLEC2, con solEng 100ng/mL durante 24h y se llevaron a cabo diversos análisis proteicos comparando las cuatro condiciones diferentes entre ellas (c-MLEC2; c-MLEC2+solEng; KO-MLEC2; KO-MLEC2+solEng). En la **Figura 52** se presentan, como ejemplo, 4 membranas de los paneles angiogénicos pertenecientes a cada una de las condiciones.



**Figura 52:** Membranas representativas del experimento *dotblot* para analizar proteínas angiogénicas en el sobrenadante de c-MLEC2 y KO-MLEC2 tratadas o no con solEng.

Las proteínas angiogénicas secretadas al medio se analizaron con un kit de captura de anticuerpos inmovilizados en una membrana de celulosa o *dotblot*. Los dos puntos del interior del cuadrado rojo representan la expresión de endoglin liberada al medio. Al comparar c-MLEC2 vs KO-MLEC2 se observa que la expresión de endoglin disminuye cuando se induce la inhibición génica.

Los listados de las ratios de todas las proteínas diferencialmente expresadas (aumentadas o disminuidas) comparando las condiciones, se muestran en los **Anexos 3, 4, 5, 6 y 7**.

En el **Anexo 3** se confrontó la condición c-MLEC2 tratadas con solEng frente c-MLEC2 sin tratar, que proporcionó información de proteínas angiogénicas afectadas y diferencialmente expresadas por el tratamiento con solEng sobre el genotipo de MLEC2 control no tratado.

En el **Anexo 4** se comparó la condición KO-MLEC2 con las células endoteliales c-MLEC2. En este listado de ratios se muestran las proteínas angiogénicas moduladas según el genotipo, es decir, proteínas diferencialmente expresadas como consecuencia de la inhibición del gen de *Eng* comparadas con el alelo completo o *WT*.

El **Anexo 5** relaciona las condiciones KO-MLEC2 tratadas con solEng y c-MLEC2 sin tratar, suministrando ratios que fueron utilizadas en las comparaciones detalladas más adelante.

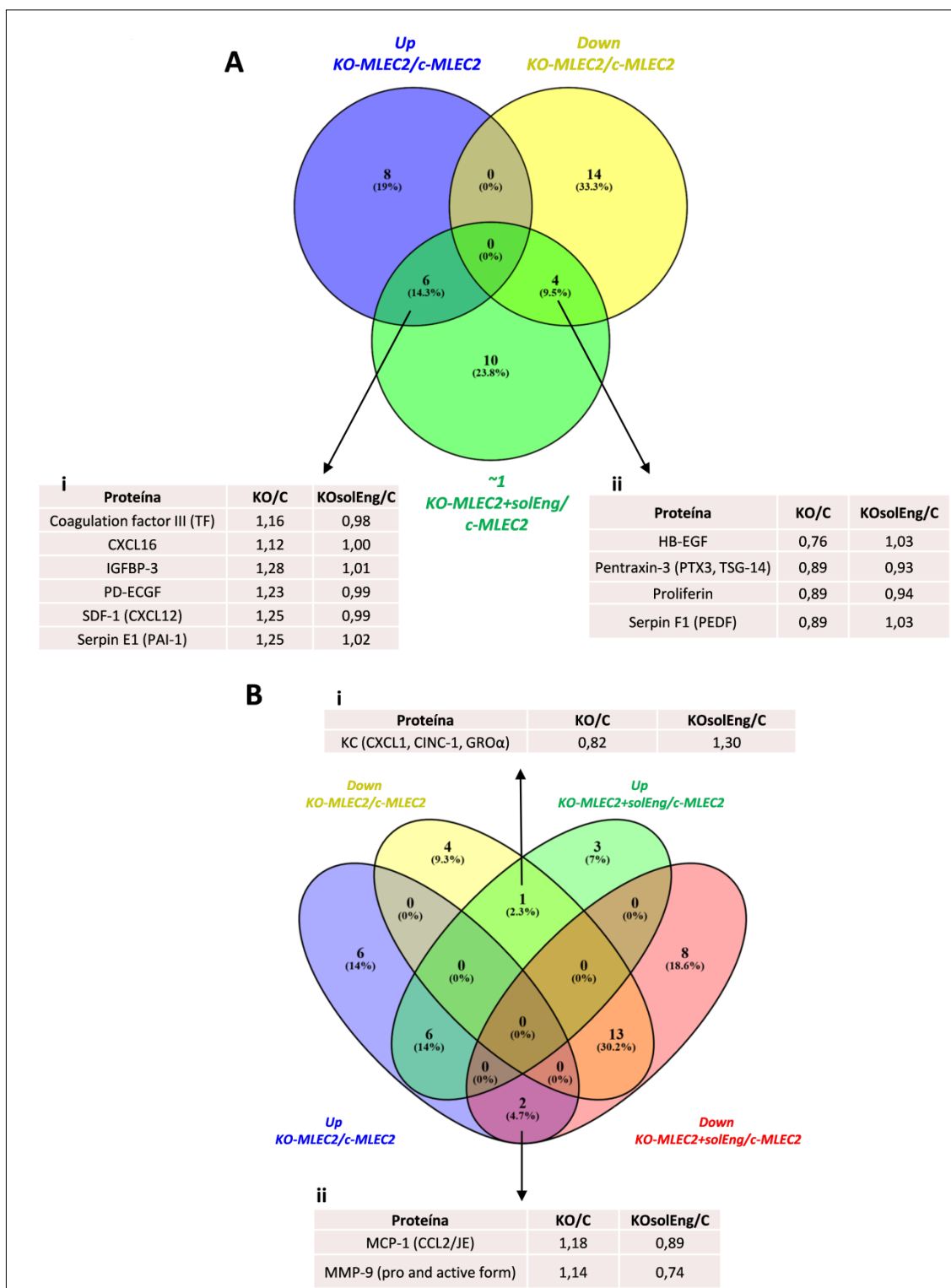
El **Anexo 6** representa las ratios entre proteínas diferencialmente expresadas de la condición KO-MLEC2 tratadas con solEng frente a la condición KO-MLEC2 sin tratar. Con ello, se obtuvo información acerca de las proteínas moduladas tras el tratamiento con solEng sólo en el genotipo KO o cuando la expresión del gen de *Eng* está inhibida.

Por último, en el **Anexo 7** se muestran las diferencias en cuanto a expresión proteica comparando la condición de KO-MLEC2 frente a las células endoteliales c-MLEC2, ambas tratadas con solEng. En este caso las ratios observadas fueron debidas únicamente a los distintos genotipos pero, a diferencia de lo que se mostraba en el **Anexo 4**, en presencia de solEng.



Una vez obtenidos todos estos listados de ratios, se realizó un análisis comparativo entre tratamientos con solEng y los genotipos, con la ayuda de los diagramas de Venn, consiguiendo una información más detallada en cuanto al efecto común de solEng sobre algunas de las proteínas angiogénicas diferencialmente expresadas.

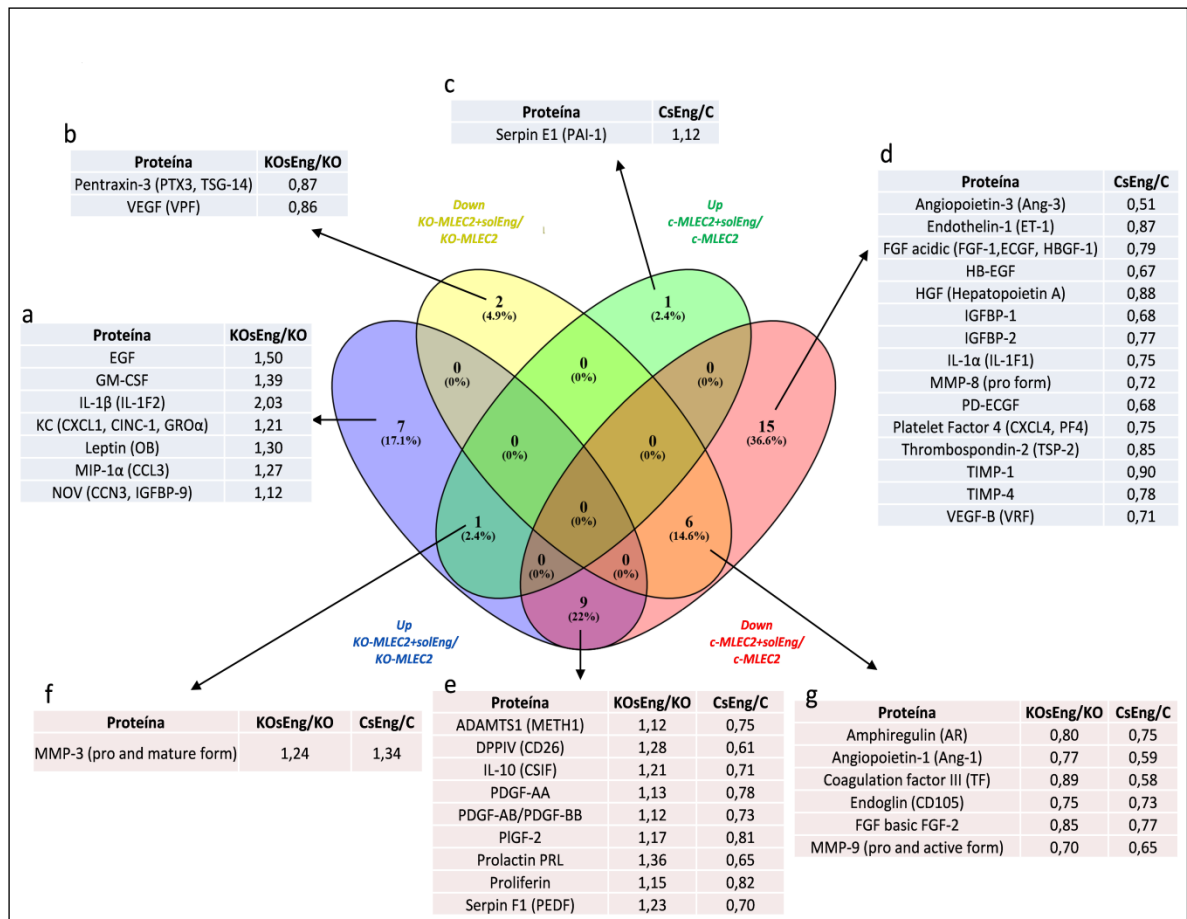
En la **Figura 53** se representan dos diagramas de Venn en los que se comparan las ratios de KO-MLEC2/c-MLEC2 (**Anexo 4**) con las proteínas que no varían tras realizar el ratio KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2 (**Figura 53A**) y las ratios de KO-MLEC2/c-MLEC2 (**anexo 4**) con KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2 (**Anexo 5**) entre sí (**Figura 53B**). El primer diagrama indica el conjunto de proteínas diferencialmente expresadas, aumentadas (círculo azul) y disminuidas (círculo amarillo), entre los dos genotipos (KO-MLEC2/c-MLEC2), comunes con las proteínas que no varían tras el tratamiento con solEng (círculo verde), o lo que es lo mismo, en las que la ratio de KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2 es cercano a 1. Así, se identificaron algunas proteínas que estando aumentadas en el genotipo KO-MLEC2, como son Factor de Coagulación III, CXCL16, IGFBP-3, PD-ECGF, CXCL12 y PAI-1, volvían a su estado basal (ratio KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2 cercana a 1), como consecuencia del tratamiento con solEng (**Figura 53A-i**). Lo mismo ocurrió con las proteínas HB-EGF, PTX3, Proliferina y PEDF que estaban disminuidas en las células endoteliales KO-MLEC2 y que, tras el tratamiento con solEng, restablecieron sus valores normales (**Figura 53A-ii**). En el segundo diagrama de Venn, en el que se comparan las proteínas aumentadas y disminuidas de las condiciones KO-MLEC2/c-MLEC2 con las condiciones KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2, destacan las proteínas CXCL1 o MCP-1 y MMP9 que disminuyen (**Figura 53B-i**) o aumentan (**Figura 53B-ii**) respectivamente en las KO-MLEC2 y, como consecuencia del tratamiento con solEng, se produce el efecto contrario, aumentando por tanto la expresión del CXCL1 y disminuyendo la de MCP-1 y MMP-9 en células KO-MLEC2 frente a las c-MLEC2.



**Figura 53:** Diagramas de Venn donde se agrupan las proteínas que presentan expresión diferencial tras comparar las ratios de KO-MLEC2/c-MLEC2 y KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2.

**A:** Diagrama donde se entrecruzan las proteínas cuyas ratios son cercanas a 1, o donde no existen diferencias entre la condición KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2 (círculo verde), y la condición KO-MLEC2/c-MLEC2 (círculo azul, proteínas aumentadas y círculo amarillo, proteínas disminuidas). En las tablas se destacan las proteínas que en condición KO están aumentadas (**i**) o disminuidas (**ii**) y tras ser tratadas con solEng vuelven a los niveles de expresión de células c-MLEC2. **B:** Diagrama que representa una comparativa entre proteínas aumentadas/disminuidas en la condición KO-MLEC2 y proteínas aumentadas/disminuidas en KO-MLEC2 tratadas con solEng. En las tablas se especifican las proteínas que tras el tratamiento con solEng aumentan (**i**) o disminuyen (**ii**) cuando en condición KO sin tratar se encuentran disminuidas o aumentadas, respectivamente.

Siguiendo con este análisis de proteínas angiogénicas, se tomaron las ratios obtenidas de la comparación de KO-MLEC2+solEng/KO-MLEC2 (**Anexo 6**), se cotejaron con las ratios resultantes de la comparación c-MLEC2+solEng/c-MLEC2 (**Anexo 3**) y se procedió a su análisis mediante un diagrama de Venn (**Figura 54**) con el fin de contrastar diferencias y similitudes entre las diferentes condiciones. Las elipses azul y amarillo representan las proteínas diferencialmente aumentadas y disminuidas, respectivamente, en las células de genotipo KO tratadas con solEng (KO-MLEC2+solEng). Las elipses verde y rojo indican las proteínas aumentadas y disminuidas, respectivamente, en células con genotipo Control tratadas con solEng (c-MLEC2+solEng). En las **tablas a, b, c y d** se nombran aquellas proteínas que solo se ven afectadas por solEng en uno de los genotipos. La **tabla e** muestra las proteínas reguladas por solEng en ambos genotipos, pero con un efecto contrario, es decir, si en el genotipo KO-MLEC2 el tratamiento con solEng disminuye los niveles de la proteína, en el genotipo c-MLEC2 los incrementa. En estos casos la regulación a la alta o a la baja de estas proteínas es dependiente del genotipo. Por el contrario, las **tablas f y g** muestran aquellas proteínas con un comportamiento común o misma tendencia en ambos genotipos (c-MLEC2 y KO-MLEC2), aumentando o disminuyendo su expresión, tras ser tratadas con solEng. En estos casos la diferencia de expresión proteica es específica del tratamiento con solEng y no de los genotipos.

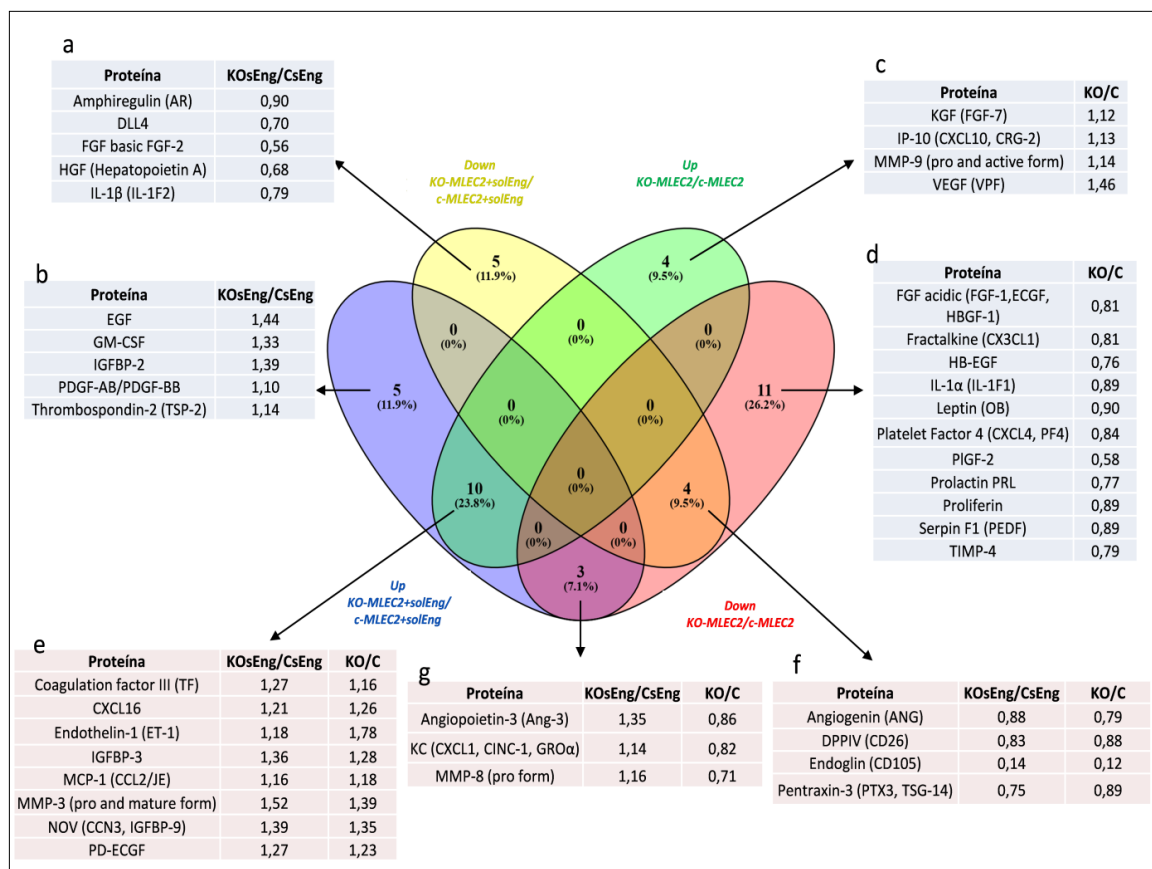


**Figura 54: Diagrama de Venn agrupando las proteínas que presentan expresión diferencial entre los genotipos tratados o no con solEng (KO-MLEC2+solEng/KO-MLEC2 y c-MLEC2+solEng/c-MLEC2).**

Diagrama donde se entrecruzan los niveles aumentados o disminuidos de las proteínas tras tratar células MLEC2 KO y C con solEng y normalizar frente a las mismas condiciones sin tratamiento. Las tablas evidencian los valores de las ratios de las proteínas indicadas comparando las distintas condiciones. En las tablas **a** y **b** se representan las proteínas disminuidas o aumentadas únicamente cuando las células KO son tratadas con solEng (KO-MLEC2+solEng). Las tablas **c** y **d** muestran listados de proteínas aumentadas o disminuidas cuando las células control son tratadas con solEng (c-MLEC2+solEng). En la tabla **e** se detallan los niveles de proteínas diferencialmente expresadas donde solEng produce un efecto contrario según se trate el genotipo celular KO o el Control. Las tablas **f** y **g** muestran las proteínas comunes entre los genotipos que tienen la misma tendencia a aumentar o disminuir después del tratamiento con solEng.

Con el fin de compararlas ratios resultantes de las condiciones KO y control tratadas con solEng (KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2+solEng) y KO y control sin tratar (KO-MLEC2/c-MLEC2), cuyos datos se encuentran en los **Anexos 7** y **4**, respectivamente, se recurrió nuevamente a un diagrama de Venn (**Figura 55**). Esta vez, las elipses azul y amarilla indican proteínas aumentadas y disminuidas, respectivamente, en las células KO-MLEC2 tratadas con solEng; y las elipses verde y roja representan proteínas aumentadas o disminuidas, respectivamente, en las células KO-MLEC2 sin tratar. Las proteínas representadas en las zonas que quedan fuera de las intersecciones, se especifican en las **tablas a, b, c y d** de la **Figura 55**. Las **tablas a** y **b** muestran las veces de disminución e inducción,

respectivamente, de las proteínas especificadas, únicamente cuando ambos genotipos tras ser tratados con solEng son comparados entre sí (KO-MLEC2+solEng/c-MLEC2+solEng). Las **tablas c y d** muestran las proteínas diferencialmente expresadas comparando células KO frente a control sin tratamiento con solEng (KO-MLEC2/c-MLEC2). El análisis de estos últimos datos permitió identificar aquellas proteínas cuyos cambios eran debidos exclusivamente a la inhibición del gen de *Eng* en las células MLEC2. Por otro lado, la tendencia de la expresión proteica que se expone en las **tablas e y f** evidenció la similitud de las ratios en las células KO tratadas o no con solEng respecto a sus respectivos controles, deduciéndose que estas diferencias comunes observadas eran debidas exclusivamente al genotipo y, por tanto, el tratamiento con solEng en este caso, no afectaba a los niveles de expresión proteica tras inducir la inhibición génica de *Eng*. La **tabla g** muestra las 3 proteínas comunes diferencialmente expresadas, cuyos ratios son opuestos al comparar las condiciones KO y KO tratados con solEng respecto a sus controles. En este caso, las ratios indicaron que el tratamiento con solEng provocaba un efecto contrario en los niveles proteicos disminuidos de forma basal en las células KO-MLEC2.



Las tablas **a** y **b** representan las proteínas diferencialmente expresadas sólo cuando las células KO-MLEC2son tratadas con solEng. Las tablas **c** y **d** muestran la diferencia de expresión de las proteínas afectadas únicamente por el genotipo KO. Las tablas **e** y **f** indican las proteínas donde la tendencia entre las ratios KO-MLEC2/c-MLEC2 tratadas y no tratadas con solEng son similares, evidenciando que estos cambios no dependen del tratamiento con solEng. La tabla **g** presenta las proteínas con una tendencia opuesta entre las células KO-MLEC2 tratadas o no con solEng, señalando, en este caso, que el efecto del tratamiento con solEng es dependiente de la expresión de endoglina.

Con la finalidad de estudiar el efecto antiangiogénico de solEng en la modulación del desarrollo vascular durante la formación de las MAV, se utilizaron ratones KO inducibles para el gen de *Eng* (Allinson y col., 2007).

En este modelo murino ( $Eng^{2fl/2fl} VE-Cre^{ERT2}$ ) el gen de *Eng* se inactiva, de forma específica, en las células endoteliales, lo que es comparable al genotipo HHT1. Se eligió la retina porque es un órgano en el que la vasculogénesis y angiogénesis es postnatal y es considerado uno de los mejores modelos para ver el efecto de un tratamiento sobre la formación de vasos y en nuestro caso, malformaciones arteriovenosas (MAV).

Como se indicaba en Materiales y Métodos, para inhibir la expresión del gen de *Eng* en los ratones, se les suministraban dos inyecciones subcutáneas con tamoxifeno en los días postnatales 2 y 4. Seguidamente, se llevaba a cabo el genotipado de las camadas (**Figura 56**), para identificar cuáles eran KO para *Eng* en las células endoteliales (*Eng<sup>fl/fl</sup> VECre*) y que podían expresar por tanto la enzima Cre-recombinasa causante de eliminar los exones 5 y 6 del gen, y cuales podían considerarse WT (*Eng<sup>fl/fl</sup>*) o con el alelo completo de *Eng* por no expresar la Cre-recombinasa.

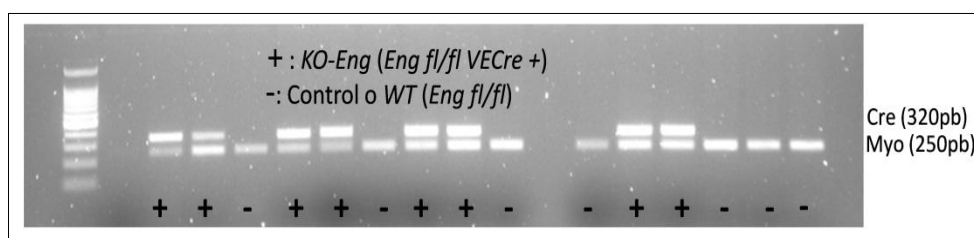


Figura 56: Genotipado del modelo murino *Eng*<sup>2fl/2fl</sup> *VE-Cre*<sup>ERT2</sup> mediante la detección de Cre-recombinasa y Miogenina (*Myo*).

El DNA extraído de la cola de las crías, tras la inyección SC de tamoxifeno 15mg/mL, fue amplificado mediante PCR con los oligos específicos ya descritos en la sección de Materiales y métodos, para la enzima Cre-recombinasa y la miogenina (Myo). Cada una de las calles del gel corresponde al genotipado de un ratón, considerándose, KO para

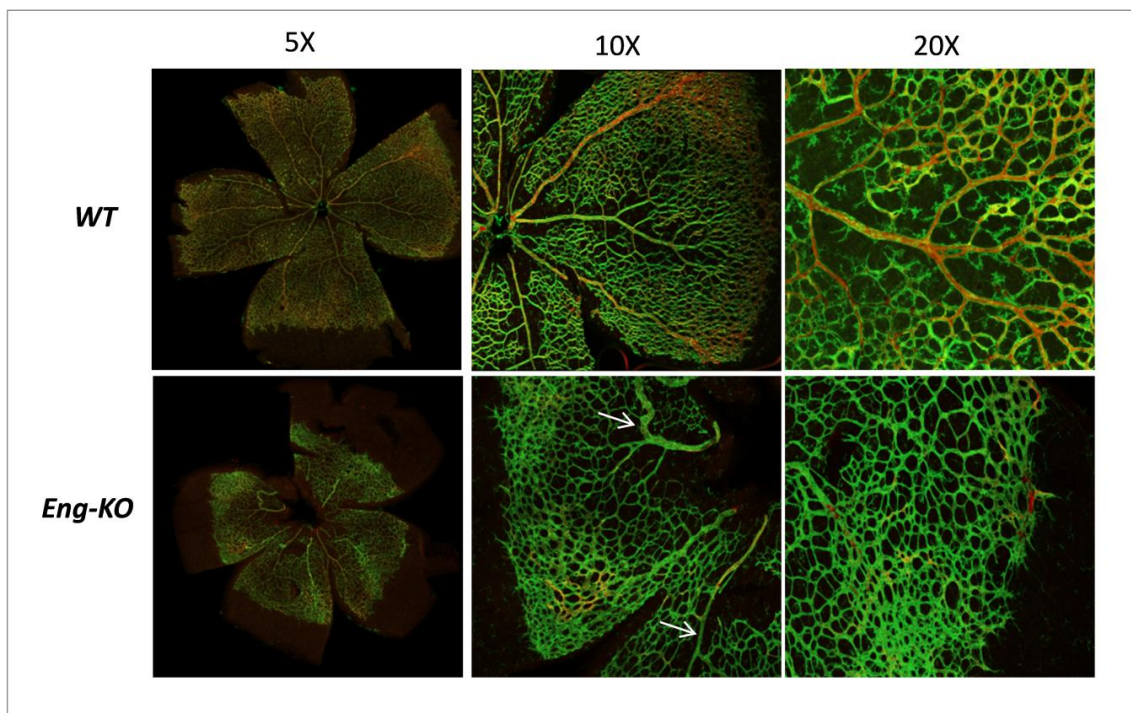
Eng cuando expresa Cre-recombinasa (+) y *WT* cuando no la expresa (-). La expresión de Myo se utilizó como control de amplificación y de carga.

Los posteriores experimentos y medidas se efectuaron sobre las retinas extraídas en el día postnatal 7, tanto de los ratones *WT* como *KO* para el gen de *Eng* (considerados HHT1), tras el tratamiento de forma intraocular en el día p5 (48 horas de tratamiento) con solEng 100ng/mL del ojo izquierdo o PBS (diluyente de la solEng) en el ojo derecho. Así se obtuvieron cuatro condiciones diferentes, que se compararán constantemente en esta sección de resultados: “retinas control” correspondientes a las de los genotipos *WT* y *KO* tratadas con PBS y “retinas tratadas”, correspondientes a las de los genotipos *WT* y *KO* tratadas con solEng.

Con la finalidad de facilitar el estudio de la angiogénesis, se realizaron tinciones por inmunofluorescencia con diferentes marcadores de la red vascular: Isolectina-Alexa488, que marcó en verde las células endoteliales de la vasculatura; Endogлина-Alexa568 que marcó en rojo la endogлина de membrana y SMA-Cy3 que marcó en rojo la  $\alpha$ -actina de las células musculares, indicando la presencia de posibles arterias.

En la **Figura 57** se muestra únicamente la comparación de la morfología vascular de dos retinas pertenecientes a los dos genotipos, *WT* y *Eng-KO*, marcadas con Endogлина e Isolectina. Estas diferentes tinciones permitieron distinguir toda la red vascular marcada con Isolectina y cómo la expresión de endogлина de membrana de las células endoteliales era menor en el genotipo *Eng-KO* con respecto a las retinas *WT*, dependiendo de la penetrancia o porcentaje de inhibición del gen de *Eng*. Además se pudieron apreciar las MAV en la zona de unión arteria-vena en el genotipo *Eng-KO* (HHT1).





**Figura 57:** Comparación de los dos tipos de retina de nuestro modelo animal con genotipo *Engfl/fl VECre* (*Eng-KO*) y *Engfl/fl* (*WT*).

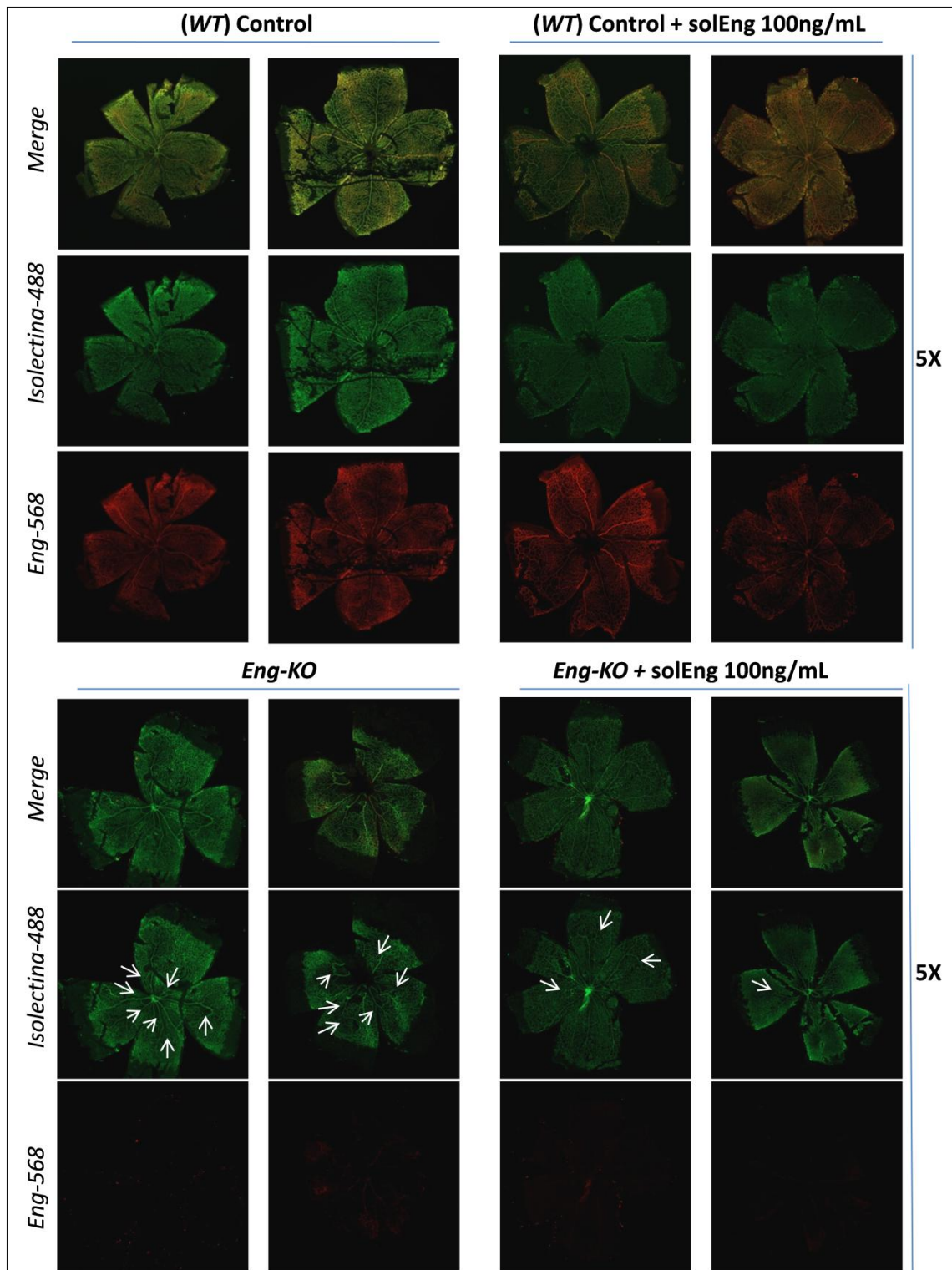
Imágenes tomadas a 5, 10 y 20 aumentos bajo el microscopio de fluorescencia. Con Alexa-488 (verde) se ha marcado la Isolectina para observar la red vascular completa. Con Alexa 568 se ha marcado Endoglina de membrana que, al teñir predominantemente las células endoteliales, marca la mayoría de los vasos. Al comparar los genotipos entre sí, el marcaje con Eng se ve disminuido en retinas *Eng-KO*. Además se observan las MAV típicas en HHT1 (indicadas con flechas).

Cuando se tiñeron las células que componen la vasculatura de las retinas con los marcadores Isolectina y Endoglina (**Figura 58**) y tras comparar las cuatro condiciones (*WT*, *WT* + solEng, *Eng-KO* y *Eng-KO* + solEng), se pudo observar, entre otras características, que la expresión de endoglina era menor en los vasos de las retinas con genotipo *Eng-KO* (estuviesen o no tratadas con solEng) respecto a sus *WT*, debido a la expresión de la recombinasa Cre, que favorecía la inhibición del gen de *Eng*. Además, en el frente de vascularización, donde hay mayor angiogénesis y las células endoteliales están más activas, aumentaba la expresión de endoglina, en comparación con los vasos ya formados y estables de la zona central. Incluso en algunas retinas *Eng-KO* esta expresión de endoglina podía ser también detectable, no sólo porque la inhibición del gen fuese a nivel endotelial, sino además porque la penetrancia del genotipo no era total. Cabe destacar cómo la solEng, parece disminuir las MAV al comparar retinas del genotipo *KO* tratadas y no tratadas.



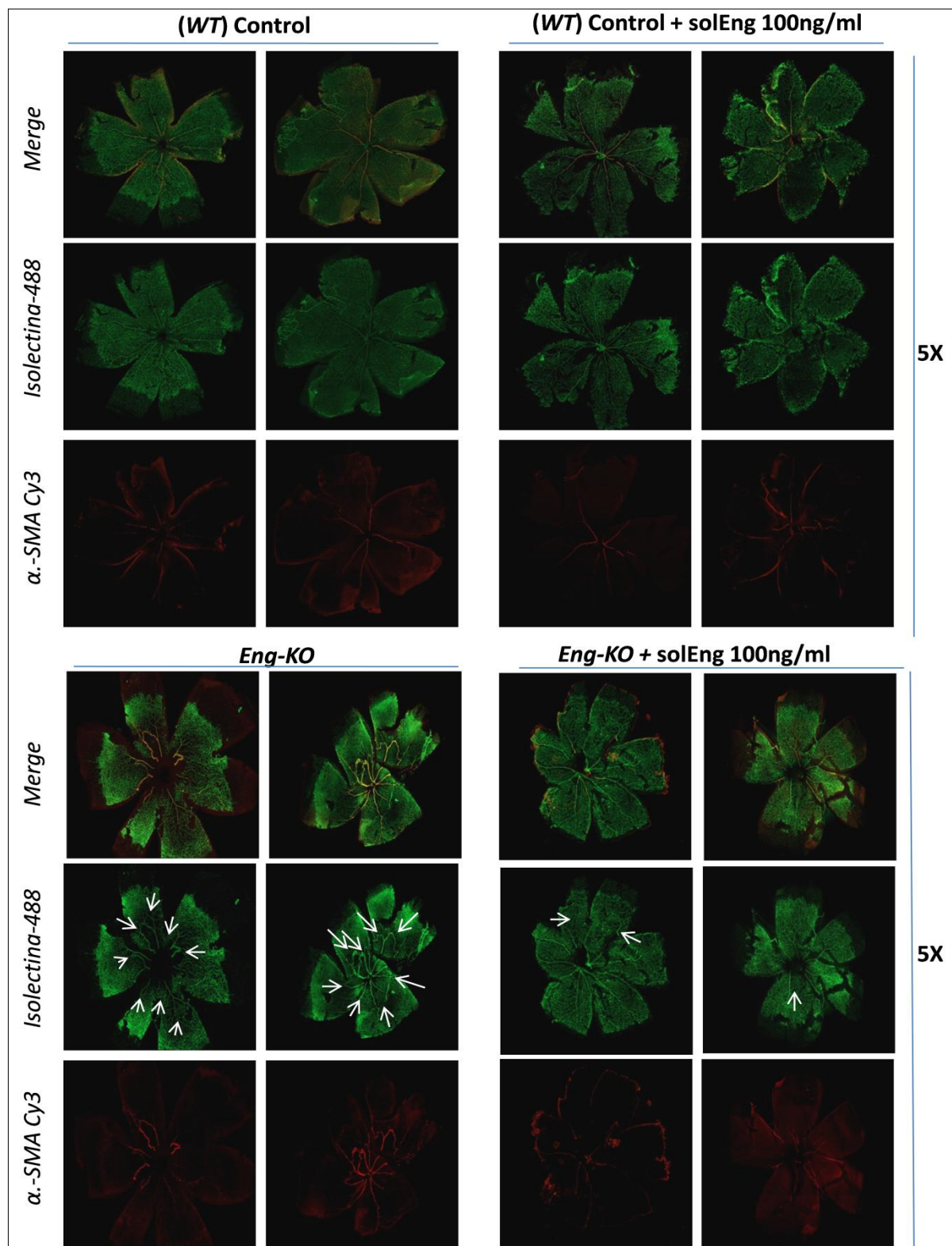
La tinción de la vasculatura de las retinas con Isolectina y  $\alpha$ -SMA (**Figura 59**) permitió la observación del marcaje de SMA, no sólo de las células musculares de las arterias del genotipo *WT*, sino también en las MAV producidas en el genotipo *Eng-KO* como consecuencia de la unión arteria-vena. Al igual que en la anterior figura, las retinas *Eng-KO* tratadas con solEng, tenían un menor número de MAV frente a las retinas *Eng-KO* sin tratar.

Las **Figuras 58 y 59** se muestran a continuación.



**Figura 58:** Expresión de Isolectina y Endoglina en vasculatura de retinas *WT*, *WT* tratadas con solEng, *Eng-KO* y *Eng-KO* tratadas con solEng.

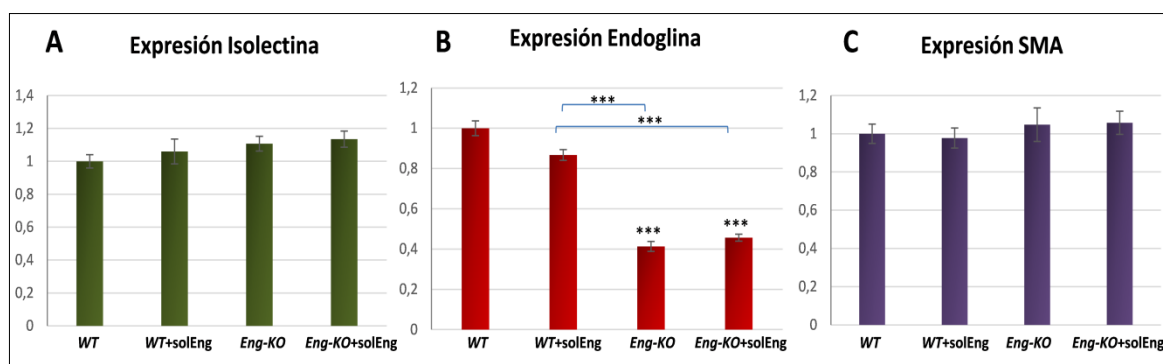
Microfotografías de retinas tomadas a 5 aumentos. Se muestran dos imágenes por condición. En cada retina se marca el endotelio vascular con Isolectina-Alexa488 (verde) y endoglina-Alexa568 (rojo) a día postnatal 7. Se observa que no hay diferencias de marcaje entre las retinas tratadas y no tratadas pero sí entre los genotipos, disminuyendo la expresión de Endoglina, como era de esperar, en retinas *Eng-KO*. Las flechas indican dónde se encuentran las MAV.



**Figura 59: Expresión de Isolectina y  $\alpha$ -SMA en vasculatura de retinas WT, WT tratadas con solEng, Eng-KO y Eng-KO tratadas con solEng.**

Microfotografías de retinas tomadas a 5 aumentos. Se muestran dos imágenes por condición. En cada retina se marca el endotelio vascular con Isolectina-Alexa488 (verde) y  $\alpha$ -SMA-Cy3 (rojo) a día postnatal 7. Parece no haber diferencias de marcaje entre los genotipos estén o no tratados con solEng. Se marcan con flechas las MAV como consecuencia de la unión directa vena-arteria en el genotipo Eng-KO.

Con la intención de comprobar si la solEng afectaba a la expresión proteica de los marcadores vasculares utilizados durante este análisis, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de Isolectina, Eng y SMA y se compararon las condiciones entre sí (**Figura 60**). Como era de esperar, la expresión de Isolectina y SMA no varió. Como consecuencia de la inhibición de la expresión del gen de *Eng*, ésta disminuyó hasta un 40% en el genotipo *KO* respecto al *WT*. El tratamiento con solEng no provocó un aumento significativo de esta expresión disminuida de endogлина a nivel de membrana.



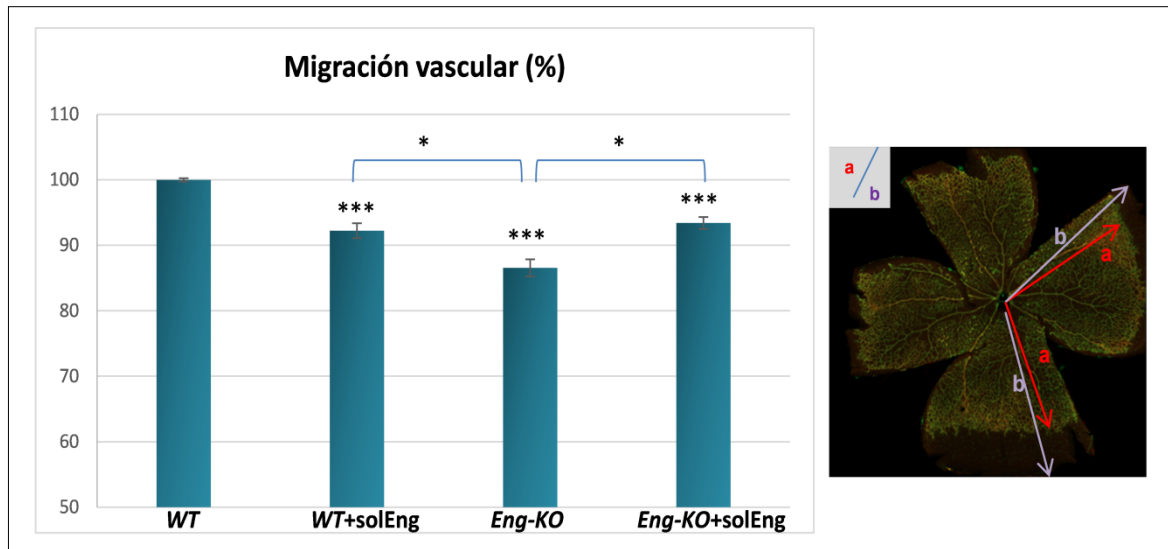
**Figura 60: Intensidad de los marcadores vasculares Isolectina, Endogлина y SMA en la red vascular comparando genotipos y tratamientos entre sí.**

**A:** Valores normalizados respecto a WT, de la media de la intensidad de fluorescencia emitida por Isolectina en la red vascular de las retinas. La expresión de Isolectina no varía entre genotipos y tratamientos. **B:** Valores normalizados respecto a WT de la media de la intensidad de fluorescencia emitida por Endogлина en la red vascular de las retinas. Se observa, como era de esperar, una disminución en la expresión de Endogлина hasta un 60-70% en las retinas *Eng-KO*. **C:** Valores normalizados respecto a WT de la media de la intensidad de fluorescencia de SMA en la red vascular de las retinas. La expresión de SMA, no varía entre genotipos y tratamientos. (\*\*\*) $p < 0,001$  respecto a la condición WT o entre condiciones marcadas en el gráfico).

Una vez obtenidas las tinciones de un número elevado de retinas de cada una de las condiciones, se analizaron exhaustivamente distintos parámetros de la estructura de la vasculatura de las retinas con el programa FIJI-ImageJ, con la finalidad de conocer el efecto de solEng sobre el fenotipo vascular de cada uno de los genotipos (*Eng-KO* vs *WT*).

En primer lugar, se realizó una medida de la migración (**Figura 61**), calculando la distancia alcanzada por el frente vascular (radio vascular) respecto al radio total de la retina. Con este dato se obtuvo la media de la longitud alcanzada por los vasos desde el centro de las retinas en cada una de las condiciones. De acuerdo con lo publicado anteriormente, la progresión del plexo vascular en retinas de ratones *Eng-KO* era menor comparada con las retinas de ratones control (*WT*). Debido a su actividad antimigratoria, el tratamiento con solEng inhibe la migración del plexo vascular en retinas de *WT*, aunque hay que destacar

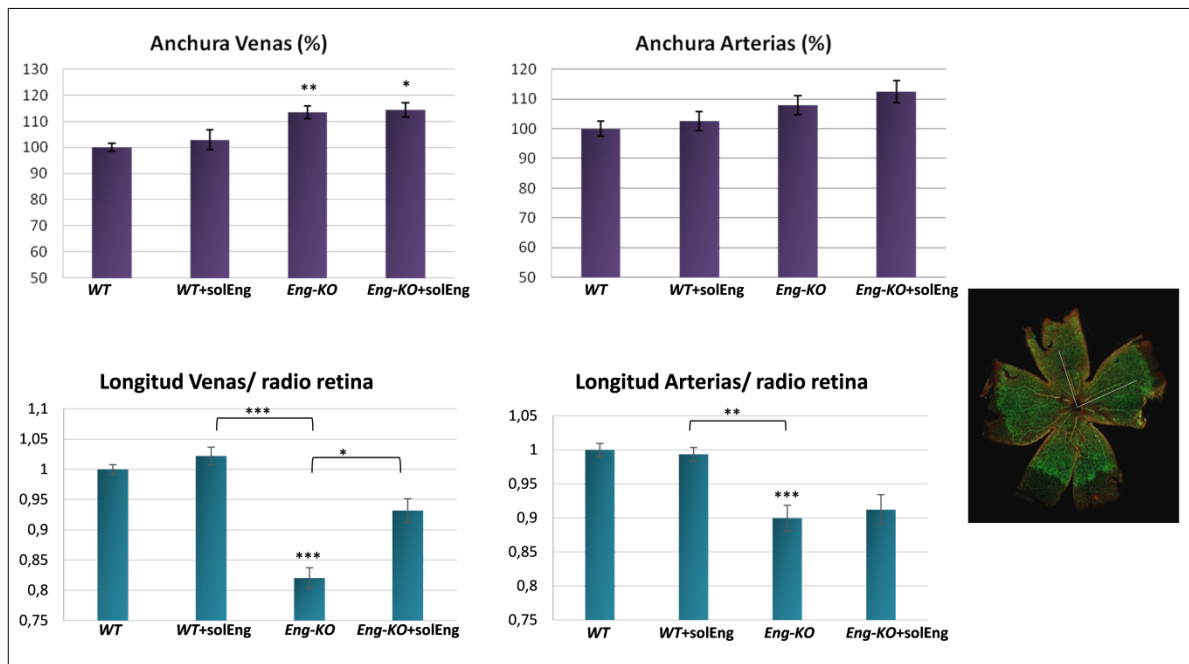
que el tratamiento con solEng de retinas *Eng-KO* favorece la migración, lo que sugiere un posible mecanismo de normalización del fenotipo en lo que a este parámetro se refiere.



**Figura 61: Porcentaje de migración del plexo vascular.**

El gráfico representa la media de la migración, en porcentaje, de todas las retinas analizadas de cada condición y de 3 medidas realizadas al azar de cada una de las retinas. Todos los porcentajes están normalizados frente a la condición *WT*. En la imagen de la retina se indican los dos tipos de radios, radio vascular (a) y radio de la retina (b), utilizados para calcular la ratio de migración. Se observa cómo la migración vascular disminuye en las retinas de *Eng-KO* y el tratamiento con solEng revierte en un pequeño porcentaje esta inhibición. N=30 (*WT*), 22 (*WT*+solEng), 27 (*Eng-KO*) y 24 (*Eng-KO*+solEng). (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a la condición *WT* o condiciones marcadas entre ellas en el gráfico).

Se analizaron, igualmente, la anchura y la longitud de las venas y arterias del plexo vascular (**Figura 62**) comparando las distintas condiciones e intentando dilucidar si la solEng tenía algún efecto sobre estos dos parámetros. Los resultados manifestaron que la anchura de las venas y arterias aumentaba en un pequeño porcentaje en las retinas *Eng-KO* respecto a las *WT*, sin que este incremento cambiase tras el tratamiento con solEng; por tanto, este parámetro no se veía afectado. La longitud de las venas y arterias, en retinas *Eng-KO* respecto a las *WT*, disminuyeron en torno a un 20 y un 10% respectivamente. Aunque se observó que la solEng no tenía ningún efecto sobre la longitud de las venas de las retinas *WT*, sí parecía revertir este parámetro en las retinas *Eng-KO*, hacia un fenotipo más cercano al control (*WT*). La longitud de las arterias, sin embargo, no se vio afectada por el tratamiento con solEng en retinas *Eng-KO*.



**Figura 62: Anchura y longitud promedio de Venas y Arterias comparando genotipos y tratamientos entre sí.**

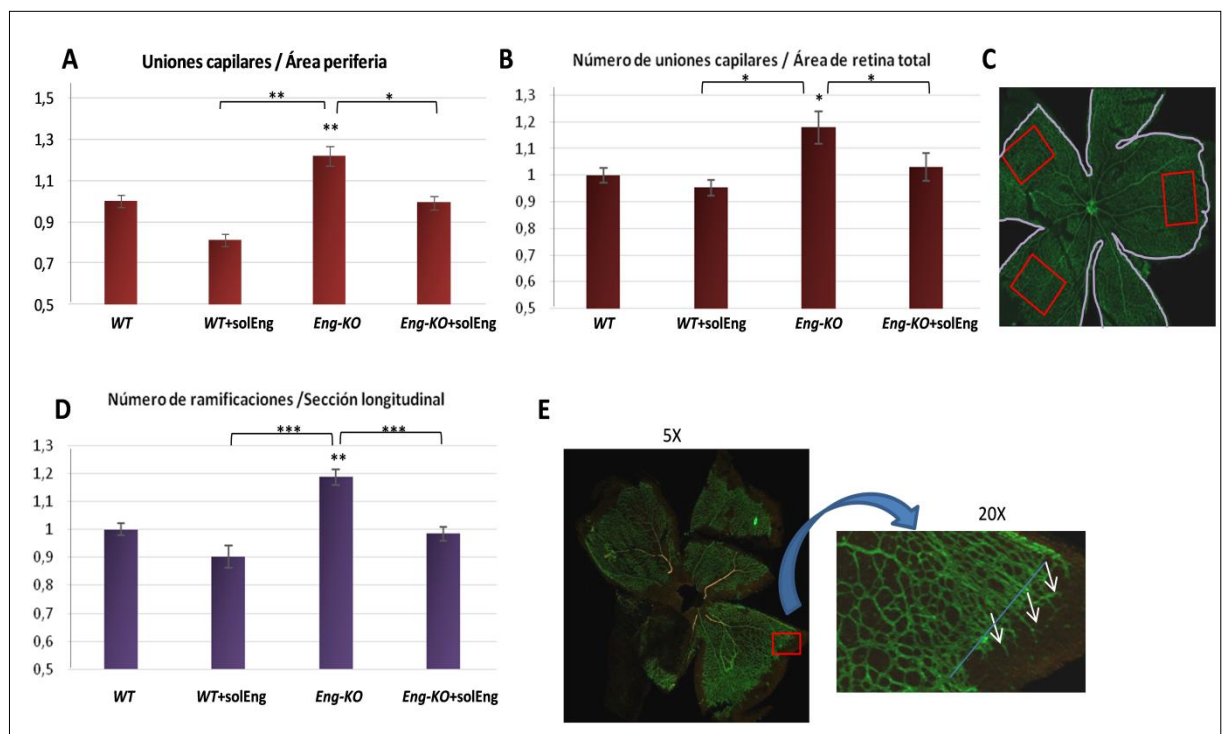
Las medidas de anchura de venas y arterias se tomaron en áreas cercanas a la región central de la retina. La longitud se calculó desde el centro, radialmente, hasta una zona próxima a la periferia de la vasculatura, donde la vena o arteria comenzaba a dividirse en vasos más pequeños (2-3 ramificaciones). Se analizaron para cada parámetro 3 arterias y 3 venas tomadas al azar, en cada una de las retinas. Los gráficos representan la media de todas las retinas analizadas de cada condición y normalizada frente a la condición WT. Se observa que la anchura de las venas aumenta en retinas *Eng-KO* comparadas con retinas WT y que el tratamiento con solEng no cambia esta tendencia. La longitud de venas y arterias disminuye en las retinas del genotipo *Eng-KO*. El tratamiento con solEng, aunque no afecta a la longitud de las arterias, incrementa la longitud de las venas de las retinas *Eng-KO*, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. La media del número de retinas utilizadas para este análisis es de 35 (WT), 25 (WT+solEng), 28 (*Eng-KO*) y 20 (*Eng-KO*+solEng). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a la condición WT o entre las condiciones marcadas en el gráfico).

El análisis del esqueleto vascular permitió la posibilidad de cuantificar las uniones capilares o número de vasos cerrados en cada una de las condiciones y el número de ramificaciones (*Sprouts* o *Tip cells*) en el límite o frente de avance de la vasculatura de las retinas, como se muestra en la **Figura 63**. El estudio de la densidad vascular se efectuó normalizando los datos obtenidos del número de vasos cerrados, de dos maneras diferentes: entre el área seleccionada donde se realizó el conteo o interpolando esos datos frente el área total de la retina (**Figura 63 A y B**, respectivamente). Ambos tipos de normalización mostraron las mismas tendencias, como se describe a continuación. El tratamiento de las retinas WT con solEng, debido a su actividad antiangiogénica, inhibió, aunque no significativamente, la formación de capilares cerrados. En las retinas del genotipo *Eng-KO* se encontraron un mayor número de uniones capilares, lo que sugirió una mayor densidad vascular. No obstante, el tratamiento intraocular con solEng disminuyó ese aumento de densidad vascular provocado en retinas *Eng-KO* de manera muy significativa (en torno al 20-25% en



las zonas de la periferia donde la vasculogénesis está más activa y en torno a un 10% en la superficie total de la retina) acercando estos valores a los de las retinas *WT* sin tratamiento.

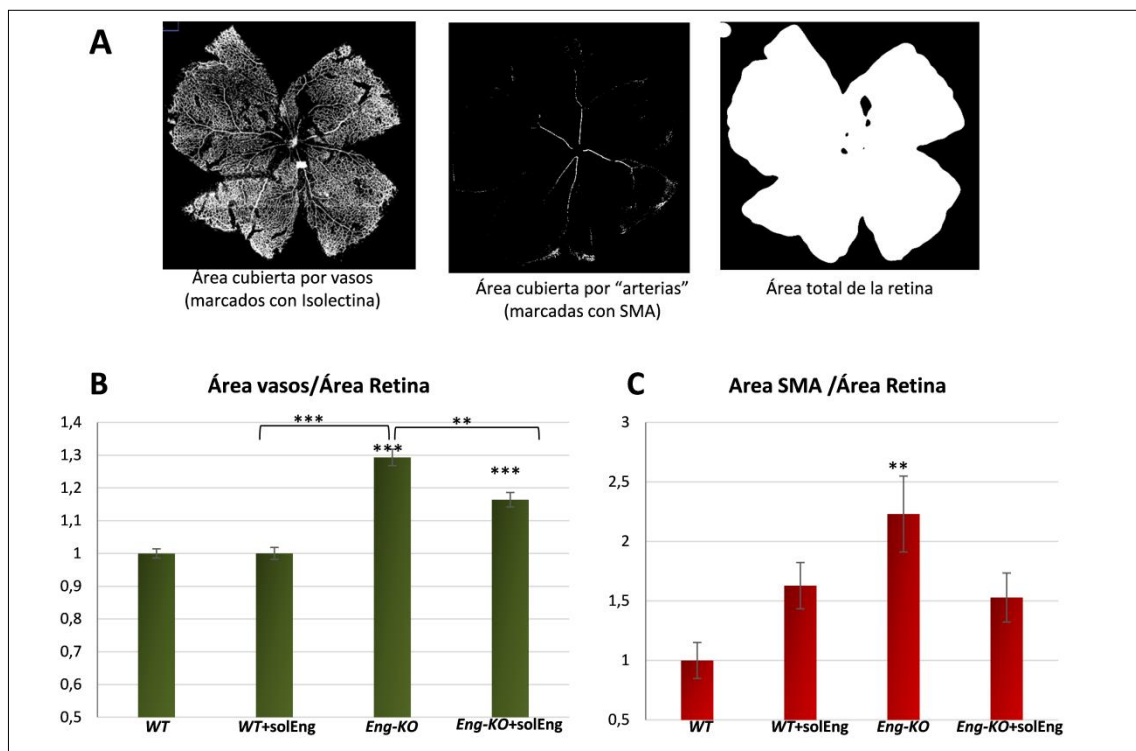
La capacidad migratoria de las células endoteliales se analizó mediante el conteo de ramificaciones o *Sprouts* (Figura 63 D y E). Los datos revelaron una tendencia a la disminución, tras el tratamiento con solEng, del número de ramificaciones en condiciones *WT*. No obstante, el aumento significativo del número de ramificaciones en retinas del genotipo *Eng-KO* respecto al *WT* se inhibió con el tratamiento de solEng, alcanzando valores considerados normales.



**Figura 63: Promedio de uniones capilares y número de ramificaciones comparando genotipos y tratamientos entre sí.**

**A:** Media de número de uniones capilares, normalizada frente al área, considerando tres áreas distintas cercanas al límite de avance de la vasculatura en cada retina. Se observa un aumento significativo de este número en retinas *Eng-KO* respecto a las *WT*, y cómo este aumento es inhibido por la solEng. **B:** Media de número de uniones capilares, normalizada frente al área total de cada retina. Se observa lo mismo que en el gráfico anterior, aunque la diferencia entre las cuatro condiciones es menor. **C:** Imagen de retina en la que se detallan las áreas de normalización: tres áreas escogidas al azar (cuadros rojos) y el área total de la retina (borde azul). **D:** Media del número de células que se encuentran migrando (*tip cells/Sprouts*) en el borde de la red vascular, normalizada frente a la longitud de la zona seleccionada en cada lóbulo de la retina. Se observa cómo la solEng disminuye el número de células que migran en el genotipo *Eng-KO*. **E:** Imagen de retina donde se muestra, con flechas, en la zona ampliada, las protrusiones filopodiales de las células endoteliales con actividad migratoria. La media del número de retinas utilizadas para este análisis fue de 35 (*WT*), 20 (*WT*+solEng), 25 (*Eng-KO*) y 20 (*Eng-KO*+solEng). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a la condición *WT* o condiciones marcadas en el gráfico).

Con el fin de corroborar los datos obtenidos, se procedió a realizar otro tipo de análisis de densidad vascular, midiendo el área ocupada por toda la vasculatura (arterias y venas) o el área ocupada solo por las arterias, comparando todas las condiciones entre sí (**Figura 64**). En la **Figura 64A** se muestra un ejemplo de imagen donde se marcan las distintas áreas utilizadas para este tipo de análisis. Tras normalizar el área ocupada por toda la vasculatura (vasos que expresan isolectina), entre el área total de la retina (**Figura 64B**), se observó que la densidad vascular era mayor en las retinas *Eng-KO* (30% más) respecto a las retinas *WT*; esta tendencia era igualmente observada en el recuento de las uniones capilares, ya descrito en el apartado anterior. El tratamiento con solEng no pareció afectar a las retinas *WT*. Sin embargo, sí producía un efecto claro y significativo sobre las retinas *Eng-KO*, disminuyendo la densidad vascular en torno a un 15%. El análisis del área ocupada por los vasos que expresaban SMA, principalmente arterias, frente al área total de la retina se muestra en la **Figura 64C**. El aumento significativo de la densidad de vasos que sobreexpresan SMA producido en las retinas *Eng-KO* con respecto a la condición *WT* se asoció con el aumento de flujo que tuvo lugar en los vasos como consecuencia de la formación de MAV. Cabe destacar la disminución del área ocupada por los vasos que sobreexpresan SMA en retinas *Eng-KO* tras el tratamiento con solEng.



**Figura 64:** Densidad vascular, resultado del análisis de las áreas ocupadas por los vasos comparando genotipos y tratamientos entre sí.

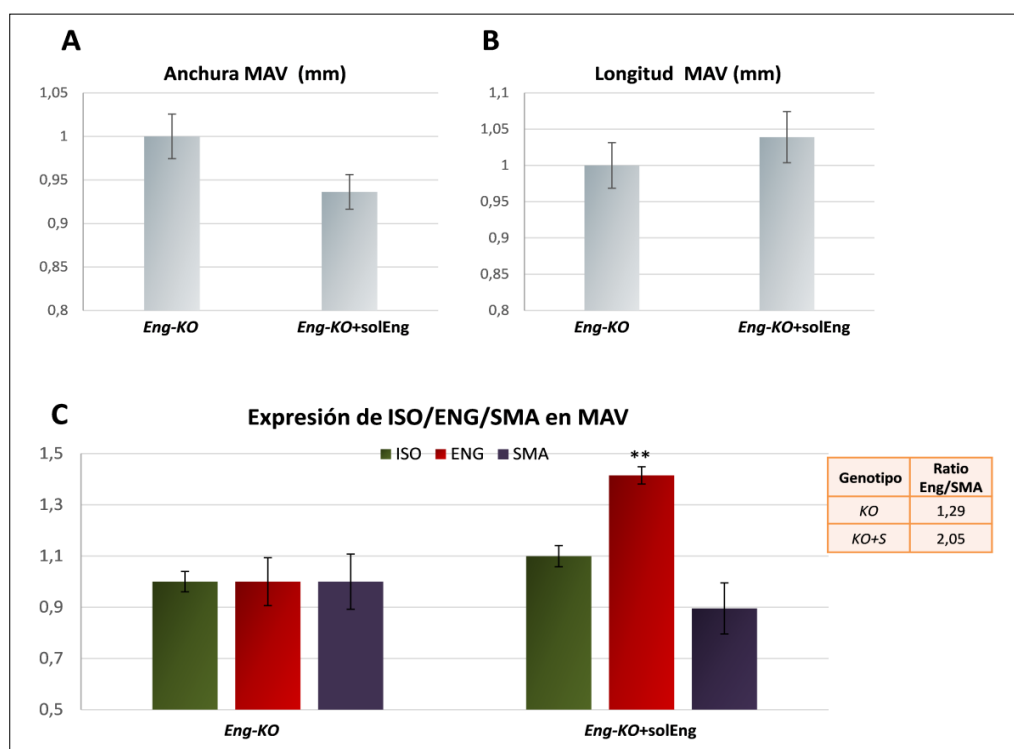
**A:** Microfotografías en blanco y negro de una retina utilizadas para analizar y normalizar las áreas seleccionadas mediante el programa FIJI. **B:** Media del área de la red vascular completa normalizada frente al área total de cada



retina. Se observa un aumento en la densidad vascular de las retinas *Eng-KO* y que la solEng disminuye este aumento. **C:** Media del área de vasos considerados "Arterias" o vasos que expresan SMA, normalizados frente al área total de la retina. En retinas *Eng-KO* este área es mayor, ya que aumenta el número de MAV. El tratamiento con solEng es capaz de revertir en cierta medida este efecto. La media del número de retinas utilizadas para este análisis ha sido de 20 (*WT*), 12 (*WT*+solEng), 15 (*Eng-KO*) y 15 (*Eng-KO*+solEng). (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a la condición *WT* o entre condiciones marcadas en el gráfico).

Adicionalmente, con el fin de conocer mejor el posible efecto de la solEng sobre las MAV que se producían en las retinas del genotipo *Eng-KO*, se midió la anchura y longitud de estas MAV, así como la expresión de las distintas proteínas (ENG, ISO, SMA) en éstas (**Figura 65**). Tras el tratamiento con solEng, los resultados obtenidos indicaron que la longitud de las MAV no se vio afectada (**Figura 65B**) aunque sí la anchura, que presentó una tendencia a disminuir (**Figura 65A**), posiblemente debido a la acción de solEng sobre el flujo de las MAV.

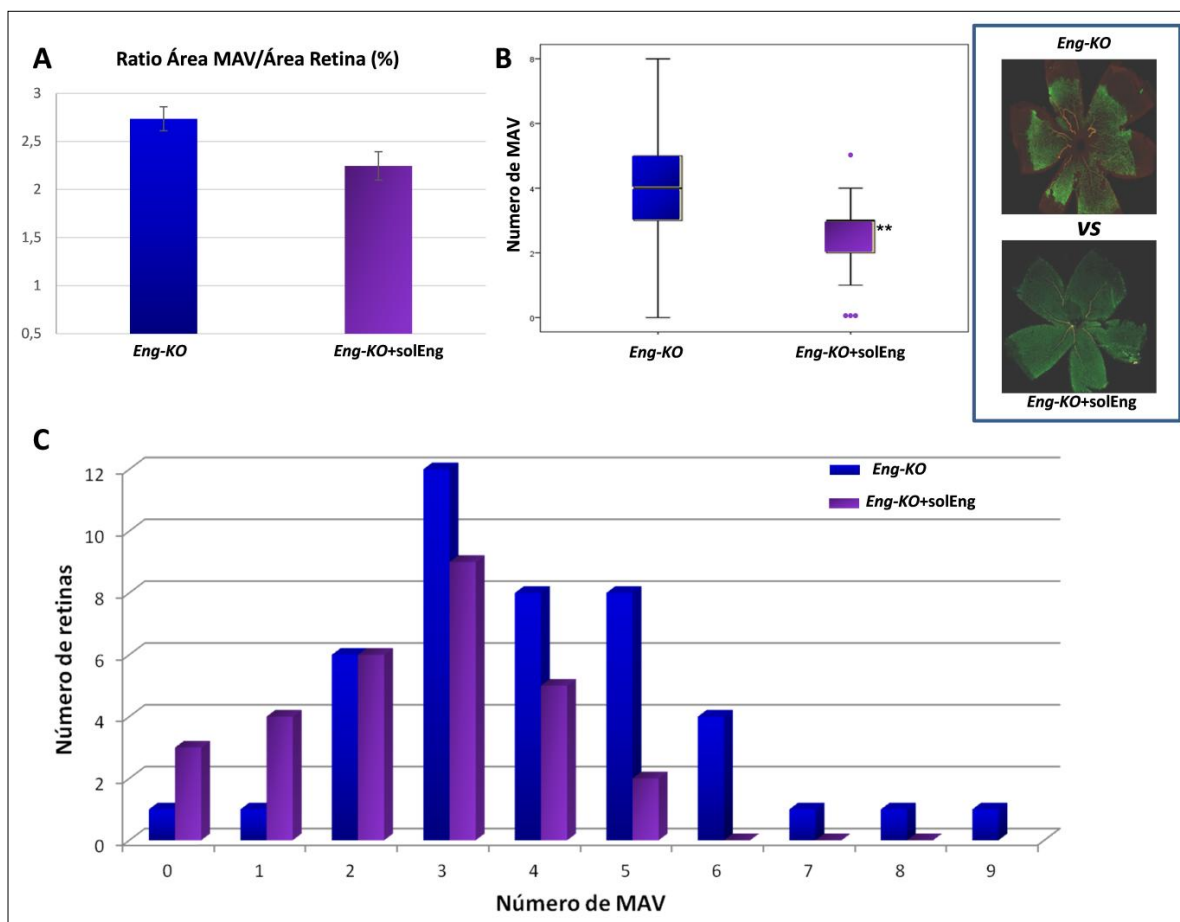
Por otra parte la medición de los distintos marcadores vasculares: isolectina, Endoglina y SMA en las MAV (**Figura 65C**), dio como resultado que tras el tratamiento con solEng, la única expresión proteica aumentada era Endoglina, aunque también la expresión de SMA presentaba una tendencia a disminuir. Como se detalla en la tabla donde se muestra la ratio Eng/SMA, parece que la solEng afecta a la expresión de ENG en las MAV, inclinando la balanza hacia un fenotipo en el que los marcadores de venas son superiores a los de arterias.



**Figura 65 (Página anterior): Anchura, longitud y expresión de Isolectina, endoglina y SMA en las MAV.**

A: Comparación de la media de la anchura de MAV en retinas *Eng-KO*, tratadas o no con solEng. Se observa una tendencia a disminuir la anchura tras el tratamiento con solEng. B: Comparación de la media de la longitud de MAV en retinas *Eng-KO*, tratadas o no con solEng. No hay diferencias en este parámetro tras tratar con solEng. C: Expresión proteica media normalizada respecto a *Eng-KO* sin tratar, de ISO, ENG y SMA. Tras el tratamiento con solEng hay una tendencia a disminuir la expresión de SMA y un aumento significativo de la expresión de endoglina de membrana en las MAV indicando un posible rescate en estas MAV del fenotipo venoso por la solEng, como se muestra en la tabla. La media del número de retinas utilizadas para este análisis fue de 25 (*Eng-KO*) y 20 (*Eng-KO*+solEng). (\*\* $p < 0,01$  respecto a la condición *Eng-KO*).

Igualmente, se compararon las áreas que ocupaban las MAV respecto al área total de la retina y el número de MAV tras el tratamiento con solEng en las retinas del genotipo *Eng-KO* (**Figura 66**). En la **figura 66A** se observa cómo el área ocupada por las MAV es menor cuando las retinas *Eng-KO* se tratan con solEng, disminuyendo ésta en alrededor de un 0,5%. Tras realizar un análisis de la mediana del número de MAV en todas las retinas contabilizadas, como se muestra en el gráfico de cajas de la **Figura 66B**, se observó que tras el tratamiento con solEng, el número de MAV tendía a disminuir. Este dato fue bastante sorprendente ya que indicaba claramente un efecto de la solEng en la reducción del número de MAV. Este análisis se puede ver de forma más clara en el gráfico representado en la **Figura 66C** donde igualmente se comparan retinas *Eng-KO* tratadas o no con solEng. Aquí se observó directamente un mayor número de retinas *Eng-KO* que contienen más MAV que las retinas *Eng-KO* tratadas con solEng.



**Figura 66: Efecto de la solEng sobre el área ocupada y número de MAV en retinas *Eng-KO*.**

A: Media en porcentaje del área ocupada por las MAV normalizada frente al área total de cada retina. Tras el tratamiento con solEng, este área tiende a disminuir. B: Gráfico de cajas donde se muestra la mediana y el rango de número de MAV encontradas en retinas tratadas y no tratadas con solEng. Se observa que el 50% de las MAV contadas y normalizadas frente al número total de retinas contabilizadas, está en torno a 3 cuando las retinas *Eng-KO* se tratan con solEng y en torno a 4 en retinas sin tratar, alcanzando un máximo de 5 MAV en retinas tratadas frente al máximo de 8 MAV que hay en retinas *Eng-KO* sin tratar. C: Representación gráfica del número de retinas analizadas y número de MAV encontradas en esas retinas. Se comparan las retinas del genotipo *Eng-KO* con retinas *Eng-KO* tratadas con solEng. Se observa que las retinas tratadas con solEng tienen un menor número de MAV que las retinas *Eng-KO* sin tratar.

# *DISCUSIÓN*

*Uno nunca se da cuenta de lo que se ha hecho,  
sólo puede ver lo que queda por hacer.*

*(Marie Curie)*

*Cada día sabemos más y entendemos menos...*

*(Albert Einstein)*



## IV. DISCUSIÓN.

### 1. Efecto del daño endotelial sobre la regulación de la expresión en la membrana celular de endogлина y la metaloproteínasa MMP14, así como la liberación de endogлина soluble.

Un desequilibrio en el proceso de remodelado vascular puede dar lugar a lesiones vasculares o patologías relacionadas con la inhibición o la activación de la angiogénesis, como pueden ser enfermedades inflamatorias, isquémicas o desarrollo de tumores, entre otras (Carmeliet, 2005). Por lo tanto, la identificación de mediadores moleculares implicados en la respuesta de daño vascular es fundamental para entender los mecanismos involucrados en la reparación vascular.

En los últimos años, cada vez más evidencias implican a la familia de los factores de transcripción *Krüppel-like*, tanto en el desarrollo de la vasculatura como en procesos de control de integridad vascular; dentro de estos factores, entre los más relacionados con la biología vascular, destacan KLF2, KLF4, KLF5 y KLF6 (Suzuki y col., 2005; Sangwung y col., 2017) los cuales se encuentran aumentados o disminuidos en diversas patologías y unidos en determinados momentos a co-activadores o co-represores, que les hacen tener incluso funciones opuestas según el tipo de célula que los exprese o el microambiente que rodee a estas células. Por tanto, es importante no sólo estudiar la regulación de estos factores, sino también su mecanismo de acción. Entre todos ellos, de acuerdo a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, se puso especial atención sobre el factor KLF6.

KLF6 es un factor de transcripción ubicuo, mayormente expresado en células hepáticas y endoteliales y considerado un modulador clave en la expresión de genes que responden al daño vascular en las células endoteliales (McConnell y Yang, 2010; Atkins y Jain, 2007). La expresión endotelial del factor KLF6 se encuentra aumentada con el daño vascular y es responsable de la activación transcripcional de varios genes involucrados en el remodelado vascular, entre los que se incluyen, endogлина, ALK1, activador del plaminógeno tipo-uroquinasa, colágeno  $\alpha 1$ , TGF- $\beta 1$ , y el receptor tipo I de TGF- $\beta$  (Garrido-Martín y col., 2013; Botella y col., 2002; Kim y col., 1998; Kojima y col., 2000).

En la primera parte de los resultados de esta tesis se muestran evidencias que apoyan la inclusión del gen *MMP14* en la lista de genes/proteínas vasculares regulados por KLF6. Utilizando, tanto un modelo *in vivo*, como experimentos *in vitro*, se demuestra que *MMP14*, proteína muy implicada en el proceso de angiogénesis, aumenta en la superficie de células endoteliales en las horas centrales del cierre de herida o lo que es lo mismo, tras un daño vascular, cuando el fenotipo migratorio de estas células se encuentra más activado. Incluso, se ha podido observar que el patrón de expresión de *MMP14* en las células endoteliales que migran se encuentra localizado en áreas específicas y, sin embargo, el patrón de expresión de *MMP14* parece ser más difuso en la monocapa de células sin activar, resultados que están de acuerdo con lo descrito por Gálvez y col., (2001).

Siguiendo el proceso de cierre de la herida endotelial, se ha demostrado una relación temporal en cuanto al incremento en los niveles de *MMP14* y KLF6, ya que el aumento de expresión génica de *KLF6* ocurre más temprano que el aumento que se produce para *MMP14*, de lo que se deduce la existencia de una posible regulación de *MMP14* a través de KLF6. La cuantificación de los niveles de menor expresión proteica de *MMP14* detectados en arterias femorales dañadas de ratones heterocigotos para *KLF6* (*KLF6*<sup>+/-</sup>) comparado con los ratones *WT* (*KLF6*<sup>+/+</sup>), es uno de los experimentos realizados que apoyan esta hipótesis de activación de *MMP14* por KLF6. También se ha podido comprobar que la supresión de KLF6 en células endoteliales disminuye la expresión de *MMP14* y la consecuente liberación de endoglina soluble al medio. Además, una expresión ectópica de KLF6 o sobreexpresión celular es capaz de transactivar enormemente la construcción del promotor génico específico de *MMP14*. En este sentido, este factor no sería el único descrito hasta la fecha, capaz de regular la expresión de *MMP14* en determinados ambientes. Estudios realizados por otros grupos, postulan que factores de transcripción de la familia E2F y Ets pueden jugar un papel importante en cáncer a través de la regulación de la actividad del gen *MMP14* (Izumiyama y col., 2005; Johnson y col., 2012). Otros estudios demuestran que los factores de transcripción Egr-1, Sp1 y Sp3 están involucrados en la regulación de la expresión de *MMP14* en células endoteliales, como consecuencia de la actuación de fuerzas hemodinámicas del microambiente, como presión sanguínea, exposición a un flujo sanguíneo anómalo y contactos de célula-matriz extracelular (Haas y col., 1999; Yun y col., 2002; Yamaguchi y col., 2002).

Este es el primer estudio en el que se analiza la actividad transcripcional del promotor génico MMP14 en respuesta al daño endotelial. Nuestros resultados nos han llevado a profundizar en la regulación potencial de KLF6 sobre MMP14. Un análisis *in-silico* de la secuencia promotora proximal de MMP14 reveló la presencia de 9 regiones consenso de unión posibles para KLF6 a lo largo del fragmento -1544/+247. Los motivos probables de unión están localizados en las posiciones -1067, -1048, -718, -635, -86, -65, +83, +152 y +175. Mediante inmunoprecipitación de cromatina se ha demostrado no sólo que KLF6 se une a las cuatro zonas específicas de unión que contienen varios sitios consenso de los anteriormente mencionados en el promotor de *MMP14* (-1142/-857, con dos motivos; -873/-569, con dos motivos; -107/+72 con dos motivos; y -7/+233, con tres motivos), sino que también se ha verificado que esta unión a las zonas anteriormente descritas es mucho mayor tras el estímulo del daño endotelial realizado sobre las células endoteliales *in vitro*. Estos resultados concuerdan con el efecto funcional de KLF6, ya observado, en experimentos de actividad transcripcional usando diferentes construcciones del promotor MMP14. Las tres construcciones (-1544/+247; -800/+247 y -300/+247) que incluyen diferente número de sitios putativos de unión de KLF6 muestran una marcada activación bajo una sobreexpresión de este factor de transcripción. Se deduce, por tanto, que KLF6 es capaz de interaccionar funcionalmente con el promotor de MMP14 estimulando su actividad transcripcional. Cabe resaltar que muchos de los motivos para KLF6 en el promotor proximal de MMP14 están localizados en regiones ricas en GC, donde se encuentran solapadas o rodeadas por sitios consenso de unión para el factor de transcripción Sp1, analizado igualmente *in silico*. La proximidad física entre los motivos para KLF6 y Sp1 sugiere una colaboración sinérgica de ambos factores de transcripción en el complejo de la maquinaria transcripcional para MMP14, cooperación plausible por datos anteriormente descritos en el laboratorio que han demostrado la existencia de una interacción física directa y una cooperación funcional entre Sp1 y KLF6 sobre los promotores génicos de endoglin y ALK1 en respuesta al daño vascular (Garrido-Martín y col., 2013; Botella y col., 2002; Garrido-Martín y col., 2010). No se descarta que Sp1, en colaboración con KLF6, pueda inhibir, mediante su unión a algún sitio de represión, la expresión endotelial de MMP14 durante el daño endotelial. De hecho, en la construcción génica de tamaño intermedio del promotor de MMP14 utilizada en esta tesis, se observó un menor incremento de activación, tras sobreexpresar *KLF6*, que en la construcción más pequeña, la cual tiene menos sitios putativos de unión para este factor. Estas conclusiones



son compatibles con estudios previos en los que se describe que Sp1, bajo un estímulo de estrés, inhibe la expresión de MMP14 (Yun y col., 2002).

Con los resultados del primer objetivo de la tesis se describe, por primera vez, que una denudación endotelial *in vitro* conlleva un aumento en los niveles de endoglina soluble, debido a la co-localización de MMP14 y endoglina de membrana y su consecuente corte y liberación de endoglina soluble al medio. Mientras que el papel de MMP14, en el remodelado vascular y los procesos celulares involucrados, se ha descrito previamente (Koziol y col., 2012; Filippov y col., 2005; Yana y col., 2007; Chen y col., 2013; Genís y col., 2006), poco se sabe del papel de la endoglina soluble durante este proceso tan específico. Niveles circulantes de endoglina soluble están aumentados en preeclampsia, hipercolesterolemia, diabetes, aterosclerosis, hipertensión arterial pulmonar severa, infarto agudo de miocardio y algunos tipos de tumores sólidos (Venkatesha y col., 2006; Gregory y col., 2014; Oujo y col., 2013; Bernabeu y col., 2009; Blázquez-Medela y col., 2010; Ikemoto y col., 2012). Cabe destacar que muchas de estas patologías están asociadas a un daño vascular. A diferencia de la función proangiogénica de la endoglina de membrana, la endoglina soluble, parece tener una función opuesta, ya que posee actividad antiangiogénica (Hawinkels y col., 2010; Venkatesha y col., 2006; Castonguay y col., 2011) y, además, es considerada un factor importante que contribuye al desarrollo patológico de la preeclampsia (Venkatesha y col., 2006; Valbuena-Díez y col., 2012). Durante el proceso de reparación vascular y remodelado tisular tras una herida se produce una angiogénesis activa y una proliferación celular endotelial, con la finalidad de restablecer una adecuada circulación en los tejidos.

De acuerdo con nuestros resultados, KLF6, factor que promueve el remodelado vascular y fuertemente expresado en tejidos muy vascularizados como la placenta y el pulmón (McConnell y Yang, 2010), puede considerarse un agente desencadenante de generación de endoglina soluble, por lo que es importante conocer el papel de la actividad antiangiogénica asociada a la endoglina soluble durante los procesos de reparación vascular. Probablemente la liberación de endoglina soluble constituye una respuesta temprana al daño vascular que detiene la angiogénesis, seguida de una segunda fase involucrada en el aumento de la regulación de la endoglina de membrana y por tanto de una activación de la angiogénesis (López-Novoa y Bernabeu, 2010; Botella y col., 2002; Torsney y col., 2002; Núñez-Gómez y col., 2017). En este sentido la liberación de endoglina

soluble puede tener importantes consecuencias a nivel celular, ya que está asociada con la disminución de la endoglina de membrana, inhibiendo por tanto la ruta de señalización dependiente de ALK1, una ruta que en células endoteliales promueve angiogénesis (López-Novoa y Bernabeu, 2010; Mahmoud y col., 2011; Núñez-Gómez y col., 2017), como se comenta en el segundo apartado de la Discusión.

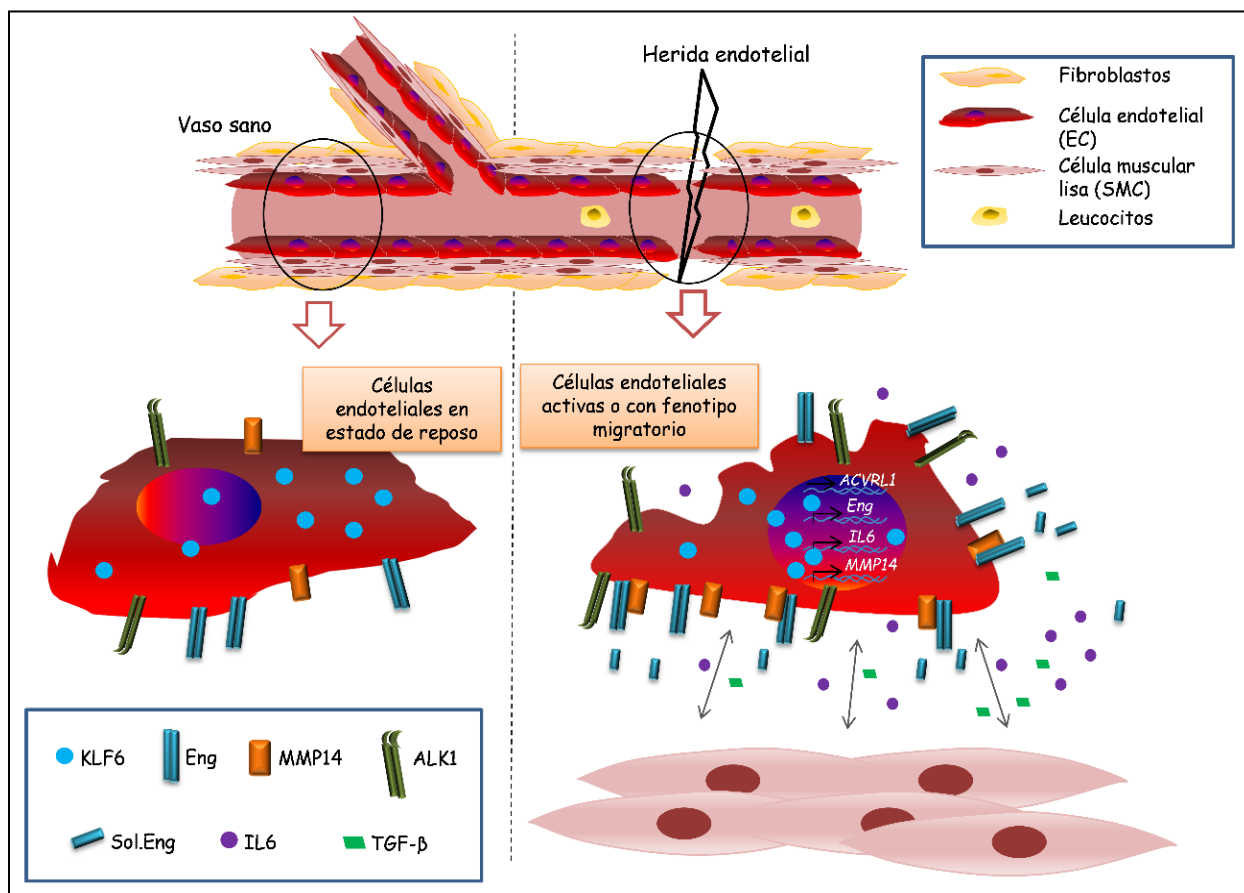
Se trataría, por tanto, de una hipótesis de “retroalimentación negativa”, donde tras un daño endotelial, como consecuencia del aumento temprano de endoglina soluble, y por tanto disminución de endoglina de membrana, se produciría una inhibición angiogénica, permitiendo la activación de procesos iniciales de reparación de heridas (coagulación, hemostasis e inflamación). En una segunda etapa, se incrementaría la endoglina de membrana, dando paso a una activación de angiogénesis y, nuevamente, a la activación concomitante de KLF6 y MMP14 a nivel endotelial. Este proceso, junto con la inflamación local, que favorece el reclutamiento de monocitos activados o macrófagos M1, los cuales pueden liberar factores como TNF- $\alpha$  (Li y col., 2003; Schlundt y col., 2015) y la metaloproteasa MMP12, capaz de cortar tanto la endoglina de su propia membrana, como la de la membrana de las células endoteliales (resultados no publicados de nuestro laboratorio), incrementaría los niveles de endoglina soluble extracelular, que a su vez actuaría como proteína antiangiogénica, activando la fase de quiescencia y estabilización del vaso, última fase del remodelado vascular. Esta hipótesis se detalla esquemáticamente en la **Figura 67**. Aun así, debido a que la función exacta de endoglina soluble no está clara, serán necesarios muchos más estudios para dilucidar su papel exacto en el proceso de reparación vascular, lo que ayudará a entender probablemente el mecanismo de muchas patologías vasculares.

Aunque los experimentos de esta tesis se han focalizado en la expresión y función de MMP14 en la célula endotelial, MMP14 puede también ser expresada por otros tipos celulares que incluyen las células musculares lisas (Filippov y col., 2005; Yana y col., 2007). Este dato está en concordancia con lo observado en los experimentos de daño endotelial en la arteria femoral de ratón, donde aumenta la expresión de MMP14 en la capa de células musculares que rodean la túnica íntima después del daño endotelial. Cabe destacar que las células musculares lisas pueden expresar también endoglina, sustrato de MMP14, en los vasos cuyo endotelio está dañado (Conley y col., 2000). A diferencia de las células endoteliales, las musculares no son dañadas directamente en el modelo animal usado en

esta tesis (Roque y col., 2000). Por lo tanto, debería existir una comunicación intercelular, entre las células endoteliales y las capas de células musculares, que explique el aumento de expresión de MMP14 en la túnica media del vaso dañado. En esta misma línea de razonamiento, cabe señalar que *in vitro* se ha observado un aumento de IL-6 a lo largo del proceso de cierre de herida en células endoteliales (Garrido-Martín y col., 2013). Además, KLF6 regula la actividad transcripcional del gen *IL-6* sugiriendo que IL-6 podría contribuir a este efecto paracrino en las células musculares que rodean al endotelio. Un estudio que demuestra la participación de IL-6 en el proceso de reparación vascular, evidencia que los ratones *KO* para el gen *IL-6*, tardan tres veces más en cerrar una herida que los animales *WT* (Galluci y col., 2000). Por esto, puede postularse que la liberación de factores solubles como IL-6 desde el endotelio dañado puede ayudar a expandir la señal de reparación desde la capa más interna a la más distante del vaso. Esta comunicación coordinada entre las células musculares y las endoteliales (Yana y col., 2007) y el aumento de expresión de MMP14 en las células musculares bajo daño vascular son concordantes con el papel crítico que tienen las células musculares durante el remodelado vascular. Además, estos datos están de acuerdo con nuestros resultados en los que se observa una hiperplasia de la túnica media durante el remodelado vascular en la arteria femoral. Así, las células musculares, que se encuentran insertas en la matriz rica en colágeno de la pared arterial, son capaces de movilizarse y activar MMP14 para degradar este colágeno intersticial y rompiendo la barrera, se infiltran, proliferan e incluso favorecen la acumulación de fibronectina (Itoh y col., 2006; Houard y col., 2003). De hecho, la delección génica de *Mmp14* favorece que los ratones tengan un estado protector contra la hiperplasia de la neointima y frente al estrechamiento del lumen *in vivo* (Filippov y col., 2005).

En resumen, estos resultados muestran, por primera vez, una relación funcional entre el factor de transcripción KLF6 y la expresión de MMP14. Además, tras un daño vascular, KLF6 es responsable del incremento de la expresión de endoglina de membrana en células endoteliales y la consecuente liberación de endoglina soluble de forma dependiente de MMP14. Los niveles de IL-6, una citoquina proangiogénica y proinflamatoria, se muestran igualmente aumentados como consecuencia de una activación de KLF6. Ambos factores, endoglina soluble e IL-6, pueden contribuir a la comunicación que se da durante la reparación del daño endotelial, entre célula endotelial y célula muscular (**Figura 67**). Estos resultados sugieren que KLF6 es un *Master regulator* (Regulador maestro) durante el daño vascular, reparación y migración, y que juega un papel importante, modulando la

liberación de endoglina soluble y su posible efecto en procesos fisiológicos y patológicos de la vasculatura.



**Figura 67. Modelo hipotético de la regulación de KLF6 durante el daño vascular.**

Tras un daño vascular, KLF6, en la célula endotelial se transloca desde el citoplasma al núcleo y activa determinados genes como *ENG* (Botella y col., 2002), *ALK1* (Garrido-Martín y col., 2013), *IL-6* (Garrido-Martín y col., 2013; y resultados de esta tesis) y *MMP14* (Gallardo-Vara y col., 2016; y resultados de esta tesis). Endoglina y MMP14, durante este proceso, co-localizan en la superficie celular. La co-localización favorece el corte de endoglina de membrana y, por tanto, la liberación de endoglina soluble (Sol.Eng) al medio extracelular. Proteínas solubles como endoglina, IL-6 y TGF- $\beta$  son factores que cumplen un papel muy importante en la comunicación célula-endotelial-célula muscular durante el proceso de remodelado vascular.

## 2. Análisis descriptivo del efecto *in vitro* de endoglina soluble sobre proteínas y genes implicados en angiogénesis

La endoglina soluble está considerada hasta la fecha como factor antiangiogénico (Castonguay y col., 2011; Hawinkels y col., 2010), pero, a día de hoy, poco más se sabe acerca de sus efectos funcionales en las células endoteliales, así como las proteínas sobre las que puede estar actuando. En esta segunda parte de la tesis, se indaga sobre el efecto de endoglina soluble en la modulación de determinadas proteínas y rutas de señalización.

El modelo endotelial fue el escogido para su estudio, debido a que la señalización de TGF- $\beta$  es clave en la célula endotelial durante el proceso de angiogénesis y en la generación de una vasculatura anómala presente en diversas patologías. Estudios previos en la vasculatura describieron que la metaloproteasa MMP14 anclada a membrana era la responsable del corte de endoglina de membrana, liberando la endoglina soluble al medio (Hawinkels y col., 2010; Valbuena-Díez y col., 2012). Actualmente, existen estudios que implican a otras metaloproteasas de diferentes tipos celulares en el corte de endoglina de membrana, entre las que destacan la MMP12 de los macrófagos M1 (datos no publicados de nuestro laboratorio), así como a una forma soluble de MMP14 (Tobar y col., 2014).

Mediante los estudios realizados de tubulogénesis y migración endotelial se comprobó que endoglina soluble tiene un papel inhibitorio en cuanto a la formación de tubos, y un papel antimigratorio, interfiriendo no sólo con la capacidad migratoria de las células endoteliales sino también inhibiendo la activación de la metaloproteasa MMP14 que, como ya se ha explicado en el apartado anterior, cumple un papel primordial en la migración y remodelado vascular.

Con el posterior análisis realizado del secretoma de células endoteliales, tanto humanas como murinas, tratadas con endoglina soluble, utilizando *arrays* angiogénicos muy específicos, se corrobora un efecto antiangiogénico predominante sobre el proangiogénico. Se detectaron, tras el tratamiento con endoglina soluble, proteínas involucradas sobre todo en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis que se encontraban disminuidas, entre las que destacaban diversos factores relacionados con la familia de VEGF, FGF, PDGF, IGFBP y trombospondinas. Los resultados de esta tesis muestran que la endoglina soluble también puede aumentar factores considerados pro-

angiogénicos, aunque en menor medida, como ocurre con MMP8 en HUVECs, y MMP3 en células endoteliales murinas. El balance entre unos y otros factores, en momentos de vasculogénesis y angiogénesis, es crucial y dependerá de la concentración, del tiempo de exposición de ese factor, del microambiente que le rodee, así como de la presencia de otros tipos celulares que puedan a su vez liberar factores con funciones opuestas. Se podría considerar, de esta manera, que el proceso de angiogénesis, aunque fundamentalmente dividido de forma simplificada en dos grandes fases, fase de activación y fase de resolución, también consta de otros muchos pasos intermedios, como aquellos necesarios para la degradación de la matriz, la inflamación local, la quimiotaxis, la proliferación celular endotelial y la estabilización de vasos. Estos procesos deben estar estrictamente regulados bajo un balance muy fino, tanto espacial como temporal, pudiendo existir una síntesis simultánea de factores pro- y anti-angiogénicos, permitiendo así un control fino de las distintas etapas implicadas en la angiogénesis.

No sólo se realizó el estudio en detalle de diversos factores angiogénicos sino que, además, se efectuó un análisis mediante iTRAQ del secretoma de HUVECs, tratadas o no con endoglina soluble. Se obtuvo un listado de 730 proteínas aumentadas, disminuidas o sin variación, con respecto al secretoma de HUVECs sin tratar. Tras llevar a cabo una comparación de aquellas proteínas moduladas por endoglina soluble mediante el programa informático STRING (versión 10.0), dejando de lado las que no presentaban variación, se correlacionaron con diversos procesos biológicos y con funciones moleculares, estas últimas relacionadas sobre todo con la unión proteína-proteína, enzima-sustrato, y proteína-ácidos nucleicos.

Entre los procesos biológicos más destacados en los que se implican las proteínas que se encuentran aumentadas están: organización de matriz extracelular; regulación de la traducción; organización de subunidades de complejos proteicos; regulación de proliferación endotelial, entre las que destacan BMP4 y BMP6; regulación a nivel de membrana mediante receptores serina/treonina quinasas, como FBN1 (que parece regular la maduración de osteoblastos controlando los niveles de TGF- $\beta$  y BMP; Nistala y col., 2010); desarrollo vascular, como AIMP2 (citoquina con actividad inflamatoria que regula negativamente la señalización de TGF- $\beta$ , actuando como supresor tumoral y regulando la proliferación celular; Choi y col., 2009); la MMP2, y algunas cadherinas como la cadherina 5 (que cumple un papel fundamental en la polaridad celular durante la migración

endotelial y la organización del citoesqueleto; Dejana y Vestweber, 2013); respuesta a estrés celular, como RhoA (implicada en la contractilidad de miosina y organización del citoesqueleto; Arnold y col., 2017) y DUSP3 (que defosforila e inactiva a ERK1 y ERK2, entre otras; Amand y col., 2014); procesos de quimiotaxis; expresión génica; y procesos de fosforilación, como MVP (que disminuye la señalización de JAK/STAT1 y SRC/MAPK; Steiner y col., 2006).

En cuanto a los procesos biológicos en los que se involucran las proteínas que se encuentran disminuidas, son reseñables los siguientes: desensamblaje de procesos proteicos; traducción y transporte citoplásmico, en el que se implican hasta 20 tipos diferentes de proteínas ribosómicas; transporte intracelular proteico, como RAB11A (que pertenece a la familia RAS y es una GTPasa pequeña implicada en el reciclado endocítico y control de barrera endotelial; Kelly y col., 2012; Yan y col., 2016); y metabolismo de pequeñas moléculas, como calmodulina 2 y EDF1 (que regula la actividad de la óxido nítrico sintasa; Piazza y col., 2016; Bernardini y col., 2005).

De todo este listado, y tal como se destacó en la sección de Resultados, únicamente 9 proteínas se consideraron estadísticamente significativas, entre las que se destacan proteínas ribosómicas, una sintasa y la proteína morfogénica ósea BMP4, sobre la que se decidió hacer un análisis más exhaustivo, ya que pertenece a la ruta de señalización de TGF- $\beta$  y presenta un valor añadido para la presente tesis.

El aumento de BMP4 tras el tratamiento con endoglina soluble, corroborado tanto en HUVECs como en el modelo murino *solEng*<sup>+</sup>, apoya una posible implicación de BMP4 en la modulación de la hipertensión arterial (Gu y col., 2015), en la hipertensión pulmonar (Wang y col., 2015; Wu y col., 2014; Frank y col., 2005), en la invasión trofoblástica (Telugu y col., 2013), así como un posible efecto opuesto a la angiogénesis inhibida por la endoglina soluble, confirmando así este balance pro-/anti-angiogénico tan necesario durante el proceso de angiogénesis (Xia y col., 2017; Wu y col., 2014). Diversos estudios, entre los que se encuentran resultados de nuestro laboratorio, demuestran que otros factores, como el tabaco, incrementan endoglina soluble y BMP4 (Zhao y col., 2014; Ojeda-Fernández y col., 2010), estableciendo, junto con los resultados de esta tesis, una probable relación de regulación sinérgica entre ambas proteínas.

Este análisis, a gran escala de las proteínas del secretoma de células endoteliales, abre futuras vías de estudio para entender qué procesos o mecanismos de señalización pueden

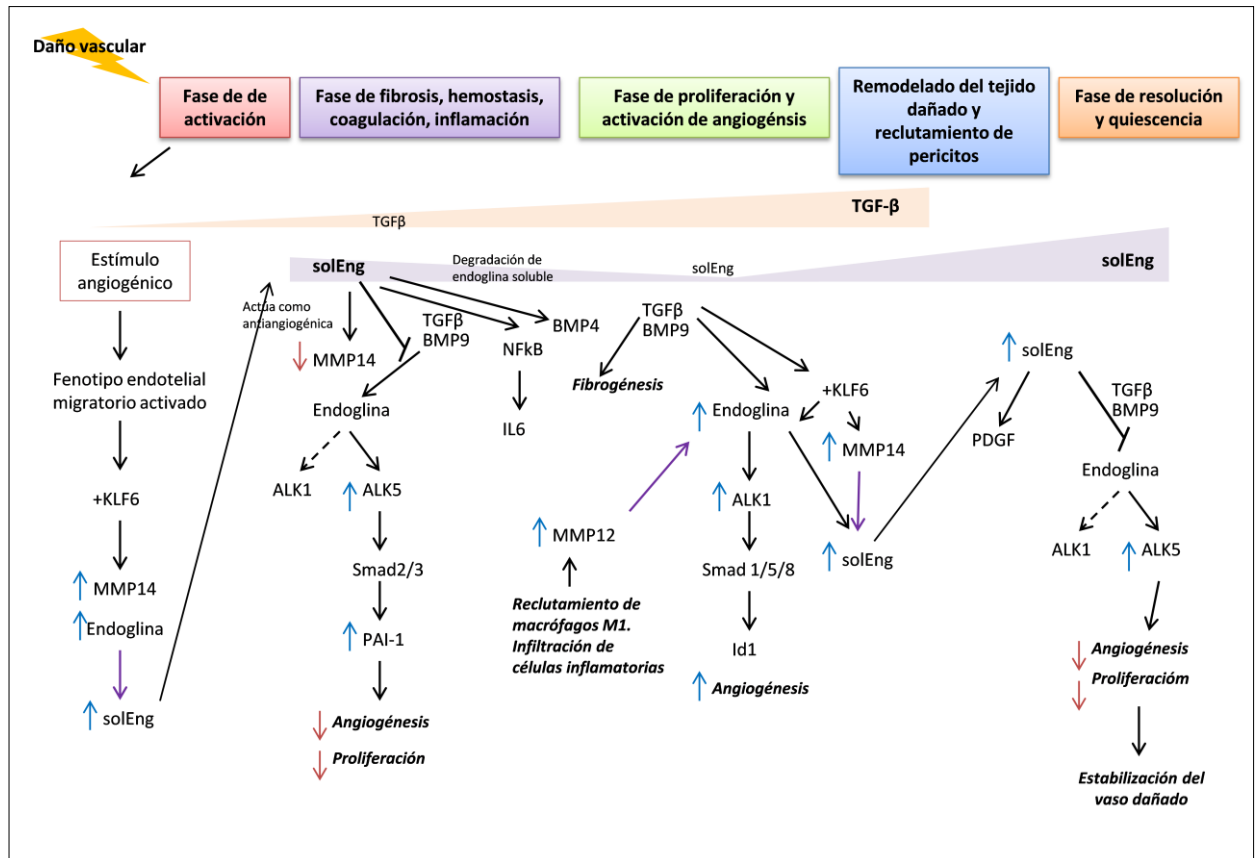
verse modulados como consecuencia del aumento de endoglina soluble y entender mejor aquellas enfermedades donde esta proteína se muestra incrementada.

Por otra parte, con la intención de comprobar si endoglina soluble contribuye a la disfunción endotelial activando su fenotipo proinflamatorio mediante una posible modulación de la señalización de TGF- $\beta$ , parte del segundo objetivo de esta tesis, se focalizó en estudiar el efecto de la endoglina soluble sobre determinados biomarcadores de inflamación vascular. Como se muestra en la sección de Resultados, el tratamiento con endoglina soluble de las HUVECs activa e incrementa la expresión génica y proteica de NF $\kappa$ B e IL-6, factores considerados clave durante procesos inflamatorios (donde los niveles de endoglina soluble suelen estar aumentados). Este aumento concomitante de ambos factores tiene relación con estudios previos, en los que se demuestra que el promotor de IL-6 contiene sitios putativos de unión para el factor NF $\kappa$ B (Libermann y col., 1990). Además de promover el crecimiento, IL-6 es una de las citoquinas más desreguladas en muchos procesos tumorales (Kumari y col., 2016), y tanto IL-6 como NF $\kappa$ B están relacionadas con la disfunción endotelial y la inflamación aguda (Aggarwal y Gehlot, 2009).

Centrándonos en la señalización de TGF- $\beta$ , cabe destacar que aunque algunos de estos miembros no se ven afectados por endoglina soluble, sí existe un incremento de expresión génica tanto de ALK5 como de PAI-1. Estos datos apoyan la hipótesis de que endoglina soluble antagoniza la función de endoglina de membrana (Oujo y col., 2013; Goumans y col., 2009). Se advierte, asimismo, un incremento de endoglina de membrana tras el tratamiento con endoglina soluble, que podría ser atribuido a la activación de otras rutas consideradas no-Smads, con la finalidad de compensar el desequilibrio del balance ALK5/ALK1, y favoreciendo la ruta ALK1/endoglina. Por tanto, la función antiangiogénica descrita para endoglina soluble puede ser atribuida al incremento de la activación de la ruta de señalización vía ALK5-Smad2/3-PAI-1, vía que se encuentra regulada a la baja por endoglina de membrana. Se podría especular, por consiguiente, que el aumento en la expresión de endoglina, junto con la activación de la señalización NF $\kappa$ B/IL-6 (Mejía-Rangel y col., 2016), podría estar relacionado con el efecto pro-inflamatorio inducido por el tratamiento con solEng de las células endoteliales. Aunque se ha dilucidado parcialmente el efecto de endoglina soluble sobre esta ruta específica de señalización, es de resaltar que aún queda mucho por investigar respecto a sus mecanismos de acción en el proceso inflamatorio.



Con el fin de resumir los resultados obtenidos y discutidos anteriormente en estos dos objetivos de la tesis, se ha realizado un esquema en el que se detalla el posible mecanismo bifásico de endoglina soluble en las distintas fases del remodelado vascular (**Figura 68**).



**Figura 68. Modelo hipotético de acción bifásica de endoglina soluble a lo largo de las distintas fases del remodelado vascular.**

Explicación de los colores de las flechas: →, indican las vías de señalización, tanto de activación como de inhibición. ↑, indican aumento de niveles de expresión del factor correspondiente. ↓, indican disminución de niveles de expresión del factor correspondiente. →, indican aumento de endoglina soluble (solEng) como consecuencia del corte de endoglina de membrana por la proteína correspondiente.

### 3. Efecto de endoglina soluble sobre las malformaciones arteriovenosas producidas en retinas de un modelo murino de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1.

Los estudios en modelos animales permiten comprobar la importancia de la expresión de determinadas proteínas en procesos, tanto fisiológicos como patológicos, y acercarnos, de esta manera, al entendimiento de rutas de señalización *in vivo*. Cada vez existen más modelos animales con fondos genéticos variables que permiten avanzar en el estudio de las enfermedades, abriendo un enorme campo dentro de la investigación.

Estudios con modelos animales donde está mutado el gen de *Eng* revelan que endoglina es esencial para el desarrollo embrionario, ya que los ratones con mutación en homocigosis son letales embrionarios (mueren en el día 10.5 *post-coitum*) como consecuencia de fallos en la vasculatura, en la formación de vasos del saco vitelino y de defectos cardíacos (Li y col., 1999; Arthur y col., 2000; Bourdeau y col., 1999), resaltando la importancia de endoglina en cardiogénesis, desarrollo vascular y angiogénesis (Garrido-Martín y col., 2014). Aunque existe el modelo murino heterocigoto para el gen de *Eng* (que sería más comparable a la patología humana HHT1), debido a su variabilidad en la penetrancia que está muy influenciada por el fondo genético de las cepas (Bourdeau y col., 2000; Tual-Chalot y col., 2015), se decidió utilizar el modelo inducible KO para *Eng* (Choi y col., 2014) con el fin de deleccionar el gen, en un momento determinado del desarrollo postnatal, por la inyección de tamoxifeno.

El modelo murino elegido para esta tesis contiene los exones 5 y 6 del alelo de endoglina flanqueado por sitios *LoxP* (Allinson y col., 2007). De esta forma, en presencia de la enzima Cre bajo expresión del promotor apropiado, en este caso VE-Cad-Cre o ROSA-Cre, se puede deleccionar de forma específica el gen de *Eng*, bien en las células endoteliales, o bien a nivel general, respectivamente. En este modelo se seleccionó la retina como el órgano más apropiado para nuestro estudio.

La retina es un tejido cada vez más empleado para el análisis del desarrollo de la vasculatura post-natal, ya que en los modelos murinos de animales recién nacidos es avascular y las arterias, venas y capilares crecen de forma muy organizada. Así, la red de vasos forma un plexo vascular en 2 dimensiones, radial y superficial desde el nervio óptico,

a partir del día post-natal 1 (p1), alcanzando el límite de la retina a día p8, a partir del cual los vasos empiezan a formar la red tridimensional (Fruttiger, 2007; Tual-Chalot y col., 2013). Por lo tanto, la vascularización de las retinas en estos modelos durante las etapas iniciales del desarrollo post-natal es de gran interés en el estudio de la vasculogénesis fisiológica y, en nuestro caso, patológica, debido a la mutación génica en homocigosis de *Eng* en células endoteliales.

Para esta tesis, se utilizó un tratamiento local, intraocular, de endoglina soluble, sobre el modelo murino de neovascularización de retina *Knock out* para el gen de *Eng*, con el fin de analizar su efecto antiangiogénico sobre las malformaciones arteriovenosas que se forman, como un posible tratamiento para enfermos HHT1. Existen terapias antiangiogénicas como el propanolol (Albiñana y col., 2012), bevacizumab (Dupuis-Girod y col., 2012, 2016) y talidomida (Lebrin y col., 2010; Hosman y col., 2015) entre otras, que disminuyen los sangrados vasculares producidos por la rotura de vasos en los enfermos HHT1 y HHT2. El razonamiento que nos llevó a plantearnos esta hipótesis, fue que endoglina soluble, además de considerarse un factor antiangiogénico, realiza el efecto antagónico al de endoglina de membrana. En este sentido, el dominio extracelular de endoglina es capaz de unirse al dominio extracelular de ALK1 y otros receptores tipo I y II (Blanco y col., 2005; Guerrero-Esteo y col., 2002). Por tanto, se puede especular que endoglina soluble podría estabilizar los complejos de receptores conteniendo ALK1, lo que facilitaría la traducción de señal ante una falta de endoglina de membrana, mimetizando, por tanto, su función. Es de destacar que este mimetismo, ante la falta de endoglina de membrana, no sería completo, ya que su región citoplasmática cumple un importante papel en la organización del citoesqueleto de actina, en la interacción con otras proteínas, y en su fosforilación a través del dominio PDZ por ALK1 (Conley y col., 2004; Sanz-Rodríguez y col., 2004; Koleva y col., 2006).

Aunque nuestra primera intención fue comprobar si endoglina soluble tenía algún efecto sobre la generación de las malformaciones arteriovenosas, también queríamos dilucidar qué proteínas podían verse aumentadas o disminuidas tras el tratamiento con endoglina soluble de células endoteliales que expresan de forma basal endoglina (c-MLEC2) y células *KO* para *Eng* (*KO*-MLEC2). De esta manera, se ha podido adquirir un conocimiento general, analizando los diferentes secretomas, de las proteínas y por tanto rutas de señalización que pueden estar implicadas en el fenotipo de HHT1 y en el efecto de endoglina soluble.

Tras realizar diversas comparaciones de las proteínas angiogénicas moduladas entre los distintos grupos, caben destacar aquellas en las que endoglina soluble ejerce un efecto contrario en células KO-MLEC2 y c-MLEC2 (como se muestra en los resultados de la **Figura 54, tabla e**). Es decir, endoglina soluble, actuando como antiangiogénica, favorece la disminución de factores fundamentalmente proangiogénicos en las células control, y sin embargo, en las células *KO-Eng* estos mismos factores están aumentados. Estos resultados indican claramente que la presencia de endoglina de membrana es clave en la regulación de señalización y que su ausencia produce un desequilibrio en la señalización, permitiendo que la endoglina soluble tenga efectos diferentes. Entre los factores aumentados tras tratar con endoglina soluble las células KO para *Eng* (KO-MLEC2) y además, disminuidos en células control tratadas con endoglina soluble, se encuentran: PDGF, factor implicado en proliferación, supervivencia y reclutamiento de pericitos, aumentado en determinados tumores después de una terapia anti-VEGF (Zhao y Adjei, 2015; Lebrin y col., 2010); PEDF, factor considerado fundamentalmente antiangiogénico (Dawson y col., 1999); prolactina, que incrementa la tubulogénesis, migración e invasión celular (Yang y col., 2013); y DPP4 (implicada en angiogenesis, hematopoyesis y reclutamiento de células madre (Zhong y Rajagopalan, 2015)). Todo esto tiene su explicación en el balance entre factores pro-/anti-angiogénicos y pro-inflamatorios sobre los que puede actuar endoglina soluble en presencia o ausencia de endoglina de membrana.

Cabe resaltar incluso, como se muestra en la **Figura 53** de la sección de Resultados, que existen proteínas, las cuales de forma basal en las células endoteliales *Eng-KO* se encuentran aumentadas o disminuidas, y que normalizan sus niveles de expresión tras el tratamiento con endoglina soluble, llegando a los niveles de las células control *Eng<sup>+/+</sup>*. En este sentido destaca especialmente PAI-1, por tener una relación muy directa en la ruta de señalización endotelial de TGF- $\beta$ . Esta proteína, como consecuencia de la falta de expresión de endoglina de membrana en las células *KO-Eng*, se encuentra aumentada. Sin embargo, endoglina soluble es capaz de normalizar los niveles de PAI-1, disminuyéndolos hasta no existir diferencias con respecto a las células control. Este dato es relevante si tenemos en cuenta que en vez de actuar como una proteína antiangiogénica, endoglina soluble estaría, de alguna forma, mimetizando la endoglina de membrana mediante una interacción con ALK1 (Blanco y col., 2005; Guerrero-Esteo y col., 2002) para favorecer la activación de esta ruta de señalización, y aumentar así la expresión de ID1 e inhibiendo la de PAI-1.

Todo este estudio general de proteínas, afectadas o no por endoglina soluble y relacionadas con procesos angiogénicos patológicos, permitirá, en un futuro próximo, analizar nuevas rutas de señalización. De esta manera se podrá ampliar el conocimiento no sólo en enfermedades vasculares, sino también en procesos tumorales, y enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, donde endoglina soluble se presenta en altos niveles, así como en los procesos angiogénicos que juegan un papel vital y donde la expresión de endoglina de membrana varía según el tipo celular.

En cuanto al efecto de endoglina soluble inyectada de forma intraocular sobre las malformaciones arteriovenosas de retina en el modelo murino *Eng-KO*, destaca el hecho de que endoglina soluble parece mejorar, aunque de forma limitada, el fenotipo patológico de la vasculatura anormal de las retinas y, en este sentido, actúa disminuyendo la formación de malformaciones arteriovenosas.

Las diferencias más significativas en cuanto al efecto de endoglina soluble sobre la vasculatura anómala, se resumen en la **Tabla 8**, tras analizar la expresión de endoglina y SMA, medir diversos parámetros físicos de la vasculatura de la retina y, más específicamente, la existencia y número de malformaciones arteriovenosas. En esta Tabla, se puede observar en rasgos generales, que la endoglina soluble es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo generado en ratones *Eng-iKOe*, hacia un fenotipo *WT*. Dentro de estos resultados es importante destacar que la expresión de endoglina parece aumentar, de forma localizada, en las malformaciones arteriovenosas, tras el tratamiento con endoglina soluble. Este hecho concuerda con el papel primordial en el remodelado vascular desempeñado por la endoglina de membrana. Una posible explicación podría ser que endoglina soluble se uniese directamente a ALK1, dependiendo de esta manera de los niveles de expresión de ALK1 en membrana. Datos no publicados del laboratorio de la Dra. Helen Arthur apoyan esta hipótesis demostrando que en las malformaciones arteriovenosas, o en vasos más dilatados del modelo murino *Eng-KO*, se produce de forma localizada un aumento de expresión de ALK1 (descrito en la tesis de Marwa Mahmoud, dirigida por Helen Arthur y comunicación personal).

Igualmente, la importancia del papel desempeñado por endoglina y ALK1 en la vascularización de retinas ha sido demostrado recientemente por Mahmoud y col., (2010). En este estudio, usando un modelo murino inducible *KO* para el gen de endoglina en células endoteliales (*Eng-iKOe*), se manifiesta que la ausencia de *Eng* retrasa el

remodelado del plexo vascular, incrementa la proliferación celular, induce la formación de MAV localizadas en las retinas, y se incrementa SMA en las malformaciones como consecuencia del aumento del flujo (Mahmoud y col., 2010). Estos resultados, que también se han observado en esta tesis, pueden revertirse parcialmente con el tratamiento local de endoglina soluble.

Fenotipo de vasculogénesis en retinas <i>Eng-KO</i>	Rescate hacia fenotipo <i>WT</i> por inyección IO local de solEng (significación)
Migración disminuida	Sí (* $p < 0,05$ )
Longitud de venas disminuida	Sí (* $p < 0,05$ )
Longitud de arterias disminuida	No
Número de uniones capilares aumentada	Sí (* $p < 0,05$ )
Número de ramificaciones en periferia o "células punta" aumentada	Sí (** $p < 0,001$ )
Aumento de densidad vascular	Sí (** $p < 0,01$ )
Anchura de MAV aumentada	No, pero sí hay tendencia
Expresión de Eng disminuida en MAV	Sí (** $p < 0,01$ )
Expresión de $\alpha$ SMA aumentada en MAV	No, pero sí hay tendencia
Área ocupada por MAV aumentada	No, pero sí hay tendencia
Media en el número de MAV por retina aumentada	Sí (** $p < 0,01$ )

**Tabla 8: Efecto de endoglina soluble sobre distintos parámetros del fenotipo de retinas *Eng-KO*.**

Se describen los parámetros más característicos de la vasculogénesis analizados en retinas del genotipo *Eng-KO* y cómo endoglina soluble afecta a esos parámetros, "rescatando" ese fenotipo hacia un fenotipo más parecido, en cuanto a la angiogénesis, al *WT*. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre retinas de ratones *Eng-KO* y *Eng-KO* tratadas con endoglina soluble.

Como conclusión y tras el análisis del efecto del tratamiento de endoglina soluble sobre la angiogénesis y MAV de la retinas del genotipo *Eng-iKOe* y *WT* (Controles), se puede afirmar que endoglina soluble rescata parcialmente el fenotipo generado como consecuencia de la inhibición del gen de *Eng*, en retinas *Eng-KO*, acercándolo al fenotipo *WT*.

A diferencia de lo que ocurre con nuestro modelo murino, que está mutado genéticamente, diversos estudios indican que endoglina soluble puede participar en la

generación de malformaciones arteriovenosas esporádicas, ya que, en este caso, la angiogénesis anómala incrementa la endoglina soluble en el medio como consecuencia del aumento en migración y mayores niveles de metaloproteasas. Mecanísticamente, en este caso, endoglina soluble inhibe la regulación normal mediada por TGF- $\beta$  en la célula endotelial, donde las metaloproteasas son mediadores tardíos de la displasia vascular cerebral (Chen y col., 2009).

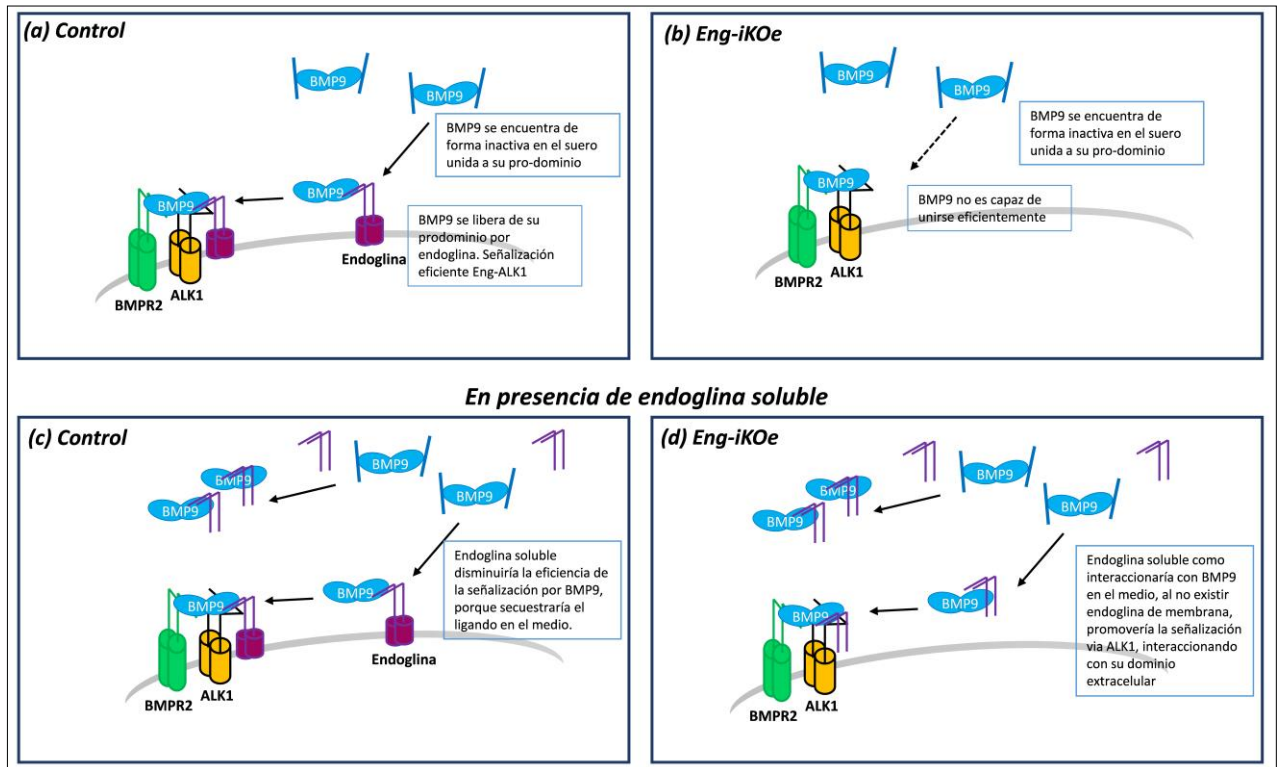
En todo el proceso de angiogénesis fisiopatológica, BMP9 debe desempeñar un rol fundamental, ya que es requerido para el correcto desarrollo de los vasos sanguíneos y linfáticos (Bidart y col., 2012; Chen y col., 2013) y recientes investigaciones señalan que el bloqueo de BMP9 genera vascularización anómala en retinas neonatales (Ruiz y col., 2016). Se trata del único factor, descrito hasta la fecha, que se puede unir directamente a endoglina en ausencia de los receptores TGF $\beta$ RI y TGF $\beta$ RII (Scharpfenecker y col., 2007; Castonguay y col., 2011; Alt y col., 2012; David y col., 2007). No obstante, endoglina puede unirse a otros miembros de la familia del TGF- $\beta$ , pero en esos casos necesita la presencia de los receptores tipo I y II para unirse a sus ligandos (Barbara y col., 1999; Letamendía y col., 1998). BMP9 y BMP10, además, se unen con alta afinidad al complejo receptor ALK1/BMPRII y esta unión, modulada por endoglina (Tual-Chalot y col., 2015), tiene un efecto potente en la activación de la ruta de señalización ALK1-Smad1/5/8, favoreciendo la neovascularización (Kim y col., 2015; Li y col., 2016) y el estado quiescente del endotelio (Tillet y Bailly, 2015; David y col., 2008; Upton y col., 2009). Bajo determinadas condiciones fisiopatológicas, como inflamación e hipoxia, endoglina soluble se libera al medio y puede secuestrar el ligando circulante BMP9 (Tual-Chalot y col., 2015), así como a TGF- $\beta$ , e impedir su acción (Venkatesha y col., 2006; Oh y col., 2000; Goumans y col., 2002).

Tras esta exposición de datos, se ha desarrollado una teoría, detallada esquemáticamente en la **Figura 69**, que daría explicación al efecto de endoglina soluble sobre la reducción de las malformaciones arteriovenosas en el modelo murino *Eng-iKOe* y de cómo este efecto es dependiente de endoglina de membrana y podría serlo también de los niveles de BMP9 en el medio. En una condición control, hipotetizando que endoglina facilita, mediante la separación de su pro-dominio, la activación de BMP9 en el medio, el factor BMP9 se uniría a endoglina, que a través de ALK1 y activaría una señalización eficiente. En este contexto, endoglina soluble actuaría secuestrando BMP9, y por tanto disminuyendo los niveles de BMP9 libre, e impidiendo que BMP9 pueda interaccionar con el complejo receptor de

endoglina de membrana y ALK1 en la superficie celular. En la condición *Eng-iKOe*, donde apenas existe endoglina de membrana, se darían bajos niveles de BMP9 que se pudiesen unir eficientemente al receptor ALK1, no se formaría el complejo endoglina/ALK1 y, por consiguiente, se favorecería la activación de la ruta opuesta, de ALK5. En la condición *Eng-iKOe* con exceso de endoglina soluble, BMP9 sí podría liberarse de forma eficiente de su pro-dominio y estar presente en la circulación para alcanzar ALK1 en la superficie celular. En este caso, aunque no hay endoglina de membrana, endoglina soluble mimetizaría su acción y podría interaccionar con la región extracelular de ALK1, incrementando así tanto los niveles de BMP9 que se unen al ligando, como la activación de la señalización mediada por ALK1.

Recientes ensayos clínicos muestran que la utilización de una proteína de fusión del dominio extracelular de ALK1 (Dalantercept) disminuye la angiogénesis tumoral al actuar como un ligando que “secuestra” BMP9 y BMP10, inhibiendo la activación de la ruta de señalización ALK1 (Mitchell y col., 2010; Hawinkels y col., 2016; Jimeno y col., 2016; Li y col., 2016). Por esta razón, endoglina soluble podría también plantearse como futura terapia en determinados tumores donde endoglina de membrana está altamente expresada; y quizás, para pacientes HHT1, donde endoglina soluble ayudaría a normalizar la vasculatura anómala, pero siempre, como terapia localizada y muy controlada.





**Figura 69. Modelo hipotético de actuación de endogлина soluble cuando endogлина de membrana está o no presente en la célula endotelial.**

a) En una condición control, el factor BMP9 se encontraría señalizando eficientemente la ruta ALK1, previa interacción con endogлина lo que facilitaría la liberación de la forma activa de BMP9 liberándola de su prodominio. b) En la condición *Eng-KO*, ante una ausencia de endogлина de membrana, la activación de BMP9 sería menor y se uniría con menor eficiencia al receptor ALK1, disminuyendo por tanto la activación de esta ruta de señalización. c) La endogлина soluble en la condición control, al existir endogлина de membrana, actuaría secuestrando BMP9, lo que disminuiría los niveles de BMP9 que podría interaccionar con el complejo endogлина/ALK1 en la superficie celular, inhibiendo la señalización mediada por ALK1. d) Ante una ausencia de endogлина de membrana (*Eng-KO*), la presencia de endogлина soluble podría ayudar a restablecer el equilibrio provocando el efecto contrario, es decir, facilitaría la señalización de BMP9 a través de ALK1 porque mimetizaría la acción de endogлина de membrana.

# CONCLUSIONES

*Aunque toda historia tiene un final,  
todo final puede ser un nuevo comienzo*

*(Anónimo)*



## V. CONCLUSIONES

**Objetivo 1:** Estudiar el efecto *in vitro* del daño endotelial sobre la regulación de la expresión en la membrana celular de la metaloproteínasa MMP14 y de endoglina, así como la liberación de endoglina soluble.

**1.1** La expresión de endoglina y MMP14, a nivel RNA mensajero y proteína, aumentan durante el daño endotelial, siguiendo una cinética paralela.

**1.2** Durante el remodelado vascular producido tras el daño endotelial, MMP14 y endoglina co-localizan en la membrana celular, facilitando así la actividad proteolítica de MMP14 sobre endoglina de membrana, y por tanto incrementando los niveles de endoglina soluble liberada al medio.

**1.3** El factor de transcripción KLF6 está implicado en el aumento de la expresión de MMP14 durante el daño endotelial. Tras un daño endotelial realizado *in vivo* en la arteria femoral de ratones heterocigotos para KLF6 (*Klf6*<sup>+/-</sup>), la expresión de MMP14 disminuye, tanto en el endotelio como en las células musculares que rodean al vaso, en comparación con ratones *Klf6*<sup>+/+</sup>.

**1.4** KLF6 transactiva, mediante su unión a las regiones ricas en GC, al promotor del gen *MMP14*, además de los genes *ENG* y *ACVRL1* (*ALK1*), previamente descritos.

**1.5** El factor de transcripción KLF6 se puede considerar como un “Regulador maestro” durante el proceso de daño endotelial activando diversos genes implicados en la angiogénesis y remodelado vascular como son *ENG*, *ALK1*, *IL-6* y *MMP14*. Así, tanto IL-6, como endoglina soluble, podrían contribuir a la comunicación entre la célula endotelial y la célula muscular, ambas involucradas en el mecanismo de cierre de herida.

**Objetivo 2:** Análisis descriptivo del efecto *in vitro* de endoglina soluble sobre proteínas y genes implicados en angiogénesis.

**2.1** Altas concentraciones de endoglina soluble, inhiben la migración endotelial y la angiogénesis disminuyendo la expresión de determinadas proteínas pro-angiogénicas que se liberan al medio como VEGF y FGF, entre otras.

**2.2** La endoglina soluble aumenta la expresión de la proteína BMP4 tanto *in vitro* como *in vivo*, así como otras proteínas de la ruta de señalización de TGF- $\beta$  a través del receptor ALK5, una vía relacionada con el estado de quiescencia e inhibición de la angiogénesis.

**2.3** La endoglina soluble activa la ruta IL-6 / STAT y NFkB, sugiriendo una posible acción sobre el fenotipo pro-inflamatorio.

**2.4** El análisis proteómico de secretomas de HUVECs tratadas con endoglina soluble, indican que ésta modula la expresión de diversas proteínas clave en procesos angiogénicos, lo que explicaría su actividad antiangiogénica.

**Objetivo 3: Efecto de endoglina soluble sobre proteínas angiogénicas en células endoteliales *iKO* para *Eng* y sobre la generación de malformaciones arteriovenosas producidas en retinas de un modelo murino de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1.**

**3.1** La endoglina soluble modula diferencialmente proteínas consideradas pro- y anti-angiogénicas, según se encuentre o no endoglina de membrana en la célula endotelial.

**3.2** La endoglina soluble inyectada de forma intraocular en retinas del modelo murino *Knock out* condicional para el gen de *Eng* (*Eng-iKOe*) modula diversos parámetros de la vasculatura anómala de la retina, incluyendo los siguientes: longitud de venas, migración vascular, número de uniones capilares, densidad vascular, área cubierta por vasos anómalos, así como anchura y número de las malformaciones arteriovenosas. Como resultado de estos efectos, endoglina soluble parece favorecer la normalización de los vasos, sugiriendo un posible rescate del fenotipo vascular de ratones *Eng-KO* hacia un fenotipo más parecido a los ratones *Eng*<sup>+/+</sup>.

# ***BIBLIOGRAFÍA***

*La fortuna juega a favor de una mente preparada*

*(Louis Pasteur)*



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla SA, Letarte M.** (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet.* 43(2):97-110.
- Adair TH, Montani JP.** (2010). Angiogenesis. San Rafael (CA): *Morgan & Claypool Life Sciences*.
- Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL.** (1998). Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 247(1):33-37.
- Adams RH, Alitalo K.** (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(6):464-78.
- Agarwal I, Karumanchi SA.** (2011). Preeclampsia and the Anti-Angiogenic State. *Pregnancy Hypertens.* 1(1):17-21.
- Aggarwal BB, Gehlot P.** (2009). Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.* 9(4):351-69.
- Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart JW, Fändrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C.** (2007). Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res.* 100(4):581-9.
- Albiñana V, Bernabeu-Herrero ME, Zarrabeitia R, Bernabéu C, Botella LM.** (2010). Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 103(3):525-34.
- Albiñana V, Recio-Poveda L, Zarrabeitia R, Bernabéu C, Botella LM.** (2012). Propranolol as antiangiogenic candidate for the therapy of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost.* 108(1):41-53.
- Allinson KR, Carvalho RL, van den Brink S, Mummery CL, Arthur HM.** (2007). Generation of a floxed allele of the mouse Endoglin gene. *Genesis.* 45(6):391-5.
- Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Bernabeu C, Marina A.** (2012). Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. *PLoS One.* 7(2):e29948.
- Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E, Colizzi F, Cattarossi I, Brasoveanu LI, Nicotra MR, Cattelan A, Natali PG, Maio M.** (1996). Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer.* 74(10):1586-91.
- Amand M, Erpicum C, Bajou K, Cerignoli F, Blacher S, Martin M, Dequiedt F, Drion P, Singh P, Zurashvili T, Vandereyken M, Musumeci L, Mustelin T, Moutschen M, Gilles C, Noel A, Rahmouni S.** (2014). DUSP3/VHR is a pro-angiogenic atypical dual-specificity phosphatase. *Mol Cancer.* 13:108.
- Andreoli V, Gehrau RC, Bocco JL.** (2010). Biology of Krüppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death. *IUBMB Life.* 62(12):896-905.



- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB.** (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 116(Pt 2):217-24.
- Argaves WS, Larue AC, Fleming PA, Drake CJ.** (2002). VEGF signaling is required for the assembly but not the maintenance of embryonic blood vessels. *Dev Dyn.* 225(3):298-304.
- Aristorena M, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, Ojeda-Fernandez L, Gallardo-Vara E, Corbi A, Botella LM, Bernabeu C.** (2014). Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J Cell Sci.* 127(Pt 12):2723-35.
- Arnold TR, Stephenson RE, Miller AL.** (2017). Rho GTPases and Actomyosin: partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. *Exp Cell Res.* S0014-4827(17)30182-9.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG.** (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol.* 217(1):42-53.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275(5302):964-7.
- Atkins GB, Jain MK.** (2007). Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res.* 100(12):1686-95.
- Atri D, Larrivée B, Eichmann A, Simons M.** (2013). Endothelial signaling and the molecular basis of arteriovenous malformation. *Cell Mol Life Sci.*
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G.** (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 1; 115 (Pt 19):3719-27.
- Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H.** (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res.* 153(2):347-58.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M.** (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* 274(2):584-594.
- Bauman TM, Huang W, Lee MH, Abel EJ.** (2016). Neovascularity as a prognostic marker in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 57:98-105.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, Tang W, Miller F, Mao R.** (2006a). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A.* 140(20):2155-62.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Markewitz B, Lewin S, Miller F, Chou LS, Gedge F, Tang W, Coon H, Mao R.** (2006b). Genotype-phenotype correlation in hereditary hemorrhagic telangiectasia: mutations and manifestations. *Am J Med Genet A.* 140(5):463-70.
- Bellón T, Corbí A, Lastres P, Calés C, Cebrián M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabéu C.** (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol.* 23(9):2340-5.

- Bellone G, Solerio D, Chiusa L, Brondino G, Carbone A, Prati A, Scirelli T, Camandona M, Palestro G, Dei Poli M.** (2007). Transforming growth factor-beta binding receptor endoglin (CD105) expression in esophageal cancer and in adjacent nontumorous esophagus as prognostic predictor of recurrence. *Ann Surg Oncol.* 14(11):3232-42.
- Benesová Y, Vasku A, Novotná H, Litzman J, Stourac P, Beránek M, Kadanka Z, Bednarík J.** (2009). Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 15(3):316-22.
- Benyon RC, Arthur MJ.** (2001). Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 21(3):373-84.
- Bergh, N., Ulfhammer, E., Glise, K., Jern, S. y Karlsson, L.** (2009). Influence of TNF-alpha and biomechanical stress on endothelial anti- and prothrombotic genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 385, 314-8.
- Bernabeu C, Conley BA, Vary CP.** (2007). Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 102(6):1375-88.
- Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M.** (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1792(10):954-73.
- Bernardini D, Ballabio E, Mariotti M, Maier JA.** (2005). Differential expression of EDF-1 and endothelial nitric oxide synthase by proliferating, quiescent and senescent microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1745(2):265-72.
- Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P.** (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest.* 128(6 Suppl):585S-590S.
- Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, Subileau M, Tillet E, Feige JJ, Bailly S.** (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci.* 69(2):313-24.
- Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG.** (2011). TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 29(5):196-202.
- Blanco FJ, Bernabeu C.** (2011). Alternative splicing factor or splicing factor-2 plays a key role in intron retention of the endoglin gene during endothelial senescence. *Aging Cell.* 10(5):896-907.
- Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, López-Novoa JM, Bernabeu C.** (2008). S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 103(12):1383-92.
- Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C.** (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol.* 204(2):574-84.
- Blázquez-Medela AM, García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Sánchez-Rodríguez A, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C.** (2010). Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 8:86.

- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF.** (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 342(18):1350-8.
- Bode AM, Dong Z.** (2007). The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog.* 46(8):591-8.
- Boehm JR, Kutz SM, Sage EH, Staiano-Coico L, Higgins PJ.** (1999). Growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression during epithelial cell stimulation by serum and transforming growth factor-beta1. *J Cell Physiol.* 181(1):96-106.
- Borges L, Iacovino M, Mayerhofer T, Koyano-Nakagawa N, Baik J, Garry DJ, Kyba M, Letarte M, Perlingeiro RC.** (2012). A critical role for endoglin in the emergence of blood during embryonic development. *Blood.* 119(23):5417-28.
- Botella LM, Albiñana V, Ojeda-Fernandez L, Recio-Poveda L, Bernabéu C.** (2015). Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet.* 31;6:115.
- Botella LM, Puig-Kröger A, Almendro N, Sánchez-Elsner T, Muñoz E, Corbí A, Bernabeu C.** (2000). Identification of a functional NF-kappa B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. *J. Immunol.* 164 (3): 1372-8.
- Botella LM, Sánchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratzu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S, Bernabéu C.** (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood.* 100(12):4001-10.
- Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Komi Y, Fernandez-L A, Varela E, Garrido-Martin EM, Narla G, Friedman SL, Kojima S.** (2009). TGF-beta regulates the expression of transcription factor KLF6 and its splice variants and promotes co-operative transactivation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction. *Biochem J.* 419(2):485-95.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG.** (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 20(3):161-8.
- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M.** (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 104(10):1343-51.
- Bourdeau A, Faughnan ME, Letarte M.** (2000). Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med.* 10(7): 279-285.
- Brown A, Barnes J.** (1994) William Harvey (1578-1657) and Marcello Malpighi (1628-1694): linked in blood, paralleled in life. *Adler Mus Bull.* 20(3):14-23.
- Brummelkamp T.R, Bernards R, Agami R.** (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science.* 296, 550-553.
- Bubici C, Papa S.** (2014). JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 171(1):24-37.
- Bühning HJ, Müller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmüller A, van Agthoven AJ, Busch FW.** (1991). Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia.* 5(10):841-7.

- Bureau C, Hanoun N, Torrisani J, Vinel JP, Buscail L, Cordelier P.** (2009). Expression and Function of Kruppel Like-Factors (KLF) in Carcinogenesis. *Curr Genomics*. 10(5):353-60.
- Burri PH, Tarek MR.** (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec*. 228(1): 35-45.
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM.** (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. 29(4):356-70.
- Byrd N, Grabel L.** (2004). Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 14(8):308-13.
- Calabrò L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C, Maio M.** (2003). Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol*. 194(2):171-5.
- Carmeliet P, Baes M.** (2008). Metabolism and therapeutic angiogenesis. *N Engl J Med*. 358(23):2511-2.
- Carmeliet P, Jain RK.** (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473(7347):298-307.
- Carmeliet P.** (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438(7070):932-6.
- Carmeliet, P.** (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 6(4):389-95.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T.** (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 21(13):2933-42.
- Carvalho RL, Jonker L, Goumans MJ, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke PT, Arthur HM, Mummery CL.** (2004). Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development*. 131(24):6237-47.
- Casado-Vela J, Martinez-Esteso MJ, Rodríguez E, Borrás E, Elortza F, Bru-Martínez R.** (2010). iTRAQ-based quantitative analysis of protein mixtures with large fold change and dynamic range. *PROTEOMICSJ*. 10:343-7.
- Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R, Grinberg AV.** (2011). Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem*. 286(34):30034-46.
- Chapman A.** (1995). William Harvey and the circulation of the blood. *J Lab Clin Med*. 126(5):423-7.
- Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M.** (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 267(27):19027-30.
- Chen CZ, Li M, de Graaf D, Monti S, Gottgens B, Sanchez MJ, Lander ES, Golub TR, Green AR, Lodish HF.** (2002). Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(24):15468-73.
- Chen G, Deng C, Li YP.** (2012). TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 8(2):272-88.

- Chen H, Brady Ridgway J, Sai T, Lai J, Warming S, Chen H, Roose-Girma M, Zhang G, Shou W, Yan M.** (2013). Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(29):11887-92.
- Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L.** (2013). Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm*. 2013:928315.
- Chen Y, Hao Q, Kim H, Su H, Letarte M, Karumanchi SA, Lawton MT, Barbaro NM, Yang GY, Young WL.** (2009). Soluble endoglin modulates aberrant cerebral vascular remodeling. *Ann Neurol*. 66(1):19-27.
- Choi EJ, Chen W, Jun K, Arthur HM, Young WL, Su H.** (2014). Novel brain arteriovenous malformation mouse models for type 1 hereditary hemorrhagic telangiectasia. *PLoS One*. 9(2):e88511.
- Choi JW, Um JY, Kundu JK, Surh YJ, Kim S.** (2009). Multidirectional tumor-suppressive activity of AIMP2/p38 and the enhanced susceptibility of AIMP2 heterozygous mice to carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 30(9):1638-44.
- Cirulli A, Liso A, D'Ovidio F, Mestice A, Pasculli G, Gallitelli M, Rizzi R, Specchia G, Sabbà C.** (2003). Vascular endothelial growth factor serum levels are elevated in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Haematol*. 110(1):29-32.
- Cleaver O, Krieg P.** (2010). Vascular development. *Heart Development and regeneration*. Chapter 8.2. p. 487-528.
- Cleaver O, Melton DA.** (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med*. 9(6):661-8.
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL.** (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*. 42(7):577-82.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabéu C, Vary CP.** (2004). Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem*. 279(26):27440-9.
- Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP.** (2000). Endoglin, a TGF- $\beta$  receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 153(2):323-35.
- Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A.** (2017). Stromal Modulators of TGF- $\beta$  in Cancer. *J Clin Med*. 6(1). pii: E7.
- Craft CS, Romero D, Vary CP, Bergan RC.** (2007). Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. *Oncogene*. 26(51):7240-50.
- Cruz-González I, Pabón P, Rodríguez-Barbero A, Martín-Moreiras J, Pericacho M, Sánchez PL, Ramirez V, Sánchez-Ledesma M, Martín-Herrero F, Jiménez-Candil J, Maree AO, Sánchez-Rodríguez A, Martín-Luengo C, López-Novoa JM.** (2008). Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 12(3):955-61.
- Cui N, Hu M, Khalil RA.** (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 147:1-73.
- Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI Jr, Dunn J, Letarte M.** (2000). Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res*. 47(1):24-35.

- Dang, D. T., Pevsner, J. y Yang, V. W.** (2000). The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 32, 1103-21.
- Das A, Fernandez-Zapico ME, Cao S, Yao J, Fiorucci S, Hebbel RP, Urrutia R, Shah VH.** (2006). Disruption of an SP2/KLF6 repression complex by SHP is required for farnesoid X receptor-induced endothelial cell migration. *J Biol Chem.* 281(51):39105-13.
- David L, Feige JJ, Bailly S.** (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20(3):203-12.
- David L, Mallet C, Keramidas M, Lamandé N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ, Bailly S.** (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res.* 102(8):914-922.
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S.** (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood.* 1;109(5):1953-61.
- Davis GE, Senger DR.** (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 25;97(11):1093-107.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP.** (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 9;285(5425):245-8.
- De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P.** (2009). Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(5): 639–649.
- Dejana E, Vestweber D.** (2013). The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 116:119-44.
- Derynck R, Zhang YE.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature.* 425(6958):577–584.
- Ding BS, Gomi K, Rafii S, Crystal RG, Walters MS.** (2015). Endothelial MMP14 is required for endothelial-dependent growth support of human airway basal cells. *J Cell Sci.* 128(16):2983-8.
- Djonov V, Baum O, Burri PH.** (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314(1):107-17.
- Docherty NG, López-Novoa JM, Arevalo M, Düwel A, Rodríguez-Peña A, Pérez-Barriocanal F, Bernabeu C, Eleno N.** (2006). Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 21(8):2106-19.
- Dong C, Li Z, Alvarez R Jr, Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ.** (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell.* 5(1):27-34.
- Downward J.** (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3(1):11-22.
- Drake CJ.** (2003). Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 69(1):73-82.
- Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ.** (2015). Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 44-46:147-56.

**Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S.** (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17(9):984-92.

**Dupuis-Girod S, Ambrun A, Decullier E, Fargeton AE, Roux A, Bréant V, Colombet B, Rivière S, Cartier C, Lacombe P, Chinet T, Blivet S, Blondel JH, Gilbert-Dussardier B, Dufour X, Michel J, Harle JR, Dessi P, Faure F.** (2016). Effect of Bevacizumab Nasal Spray on Epistaxis Duration in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 316(9):934-42.

**Dupuis-Girod S, Ginon I, Saurin JC, Marion D, Guillot E, Decullier E, Roux A, Carette MF, Gilbert-Dussardier B, Hatron PY, Lacombe P, Lorcerie B, Rivière S, Corre R, Giraud S, Bailly S, Paintaud G, Ternant D, Valette PJ, Plauchu H, Faure F.** (2012). Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output. *JAMA.* 307(9):948-55.

**Egeblad M, Werb Z.** (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2(3):161-74.

**Eilken HM, Adams RH.** (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 22(5):617-25.

**Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, Spears J, Brown DH, Buscarini E, Chesnutt MS, Cottin V, Ganguly A, Gossage JR, Guttmacher AE, Hyland RH, Kennedy SJ, Korzenik J, Mager JJ, Ozanne AP, Piccirillo JF, Picus D, Plauchu H, Porteous ME, Pyeritz RE, Ross DA, Sabba C, Swanson K, Terry P, Wallace MC, Westermann CJ, White RI, Young LH, Zarrabeitia R; HHT Foundation International - Guidelines Working Group.** (2011). International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet.* 48(2):73-87.

**Feng XH, Derynck R.** (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:659-93.

**Fernandez-L A, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Ramirez JR, Morales-Angulo C, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Bernabéu C, Botella LM.** (2007). Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): regulation of ALK-1/endoglin pathway in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 97(2):254-62.

**Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Pérez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabéu C, Botella LM.** (2005). Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res.* 1;68(2):235-48.

**Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C.** (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to chromosome 9q34qter. *Cytogenet Cell Genet.* 64(3-4):204-7.

**Ferrara N.** (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 55:15-35.

**Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F, Allen ED, Weiss SJ.** (2005). MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med.* 202(5):663-71.

**Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M.** (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene.* 22(42):6557-63.

**Förstermann U, Sessa WC.** (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33(7):829-37, 837a-837d.



- Frank D, Johnson J, de Caestecker M.** (2005). Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Chest*. 128:590S-591S.
- Fruttiger M.** (2007). Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 10(2):77-88.
- Fujimoto M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Komura K, Matsushita T, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S.** (2006). A clue for telangiectasis in systemic sclerosis: elevated serum soluble endoglin levels in patients with the limited cutaneous form of the disease. *Dermatology*. 213(2):88-92.
- Fujita K, Ewing CM, Chan DY, Mangold LA, Partin AW, Isaacs WB, Pavlovich CP.** (2009). Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *Int J Cancer*. 124(3):664-9.
- Gallardo-Vara E, Blanco FJ, Roqué M, Friedman SL, Suzuki T, Botella LM, Bernabeu C.** (2016). Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis*. 19(2):155-71.
- Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJ, Marchuk DA.** (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*. 363(9412):852-9.
- Gallo S, Sala V, Gatti S, Crepaldi T.** (2015). Cellular and molecular mechanisms of HGF/Met in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)*. 129(12):1173-93.
- Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Gurriel JL, Sugawara T, Luster MI.** (2000). Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J*. 14(15):2525-31.
- Gálvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG.** (2001). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem*. 276(40):37491-500.
- Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee UE, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C.** (2010). Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol*. 11:51.
- Garrido-Martín EM, Blanco FJ, Roqué M, Novensà L, Tarocchi M, Lang UE, Suzuki T, Friedman SL, Botella LM, Bernabéu C.** (2013). Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene. *Circ Res*. 112(1):113-27.
- Garrido-Martin EM, Nguyen HL, Cunningham TA, Choe SW, Jiang Z, Arthur HM, Lee YJ, Oh SP.** (2014). Common and distinctive pathogenetic features of arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 and hereditary hemorrhagic telangiectasia 2 animal models--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 34(10):2232-6.
- Ge AZ, Butcher EC.** (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand. *Gene*. 138(1-2):201-6.
- Genís L, Gálvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG.** (2006). MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis?. *Cancer Metastasis Rev*. 25(1):77-86.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C.** (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 161(6):1163-77.



- Gerhardt H.** (2008). VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*. 4(4): 241–6.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V.** (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 277(5323):225-8.
- Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G.** (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 902:230-9.
- Giordano P, Lenato GM, Pierucci P, Suppressa P, Altomare M, Del Vecchio G, Di Bitonto G, De Mattia D, Guanti G, Sabbà C.** (2009). Effects of VEGF on phenotypic severity in children with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 31(8):577-82.
- Goligorsky MS.** (2000). Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Int*. 58(3):1360-76.
- Gordon KJ, Blobel GC.** (2008). Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta*. 1782(4):197-228.
- Gougos A, Letarte M.** (1988b). Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol*. 141:1934-40.
- Gougos A, Letarte M.** (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. 265(15):8361-4.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Bühring HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M.** (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol*. 4(1):83-92.
- Gougos A, Letarte M.** (1988a). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*. 141(6):1925-33.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G.** (2003). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*. 13(7):301-7.
- Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P.** (2009). TGF- $\beta$  signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res*. 19(1):116-27.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P.** (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J*. 21(7):1743-53.
- Govinden R, Bhoola KD.** (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$ . *Pharmacol Ther*. 98(2):257-65.
- Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M.** (2014). Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*. 2014 Feb;35.
- Gresele P, Momi S, Migliacci R.** (2010). Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost*. 103(1):56-61.
- Gu GL, Yang QY, Zeng RL, Xu XL.** (2015). The association between BMP4 gene polymorphism and its serum level with the incidence of LVH in hypertensive patients. *J Transl Med*. 13:14.
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C.** (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor- $\beta$  receptors I and II. *J. Biol. Chem*. 277(32): 29197–29209.

- Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA.** (1999). Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem.* 274(32):22679-85.
- Haas TL, Madri JA.** (1999). Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 9(3-4):70-7.
- Hagmann H, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA, Stepan H.** (2012). The promise of angiogenic markers for the early diagnosis and prediction of preeclampsia. *Clin Chem.* 58(5):837-45.
- Harradine KA, Akhurst RJ.** (2006). Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Ann Med.* 38(6):403-14.
- Hata A, Chen YG.** (2016). TGF- $\beta$  Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8(9). pii: a022061.
- Hawinkels LJ, de Vinuesa AG, Paauwe M, Kruithof-de Julio M, Wiercinska E, Pardali E, Mezzanotte L, Keereweer S, Braumuller TM, Heijkants RC, Jonkers J, Löwik CW, Goumans MJ, ten Hagen TL, ten Dijke P.** (2016). Activin Receptor-like Kinase 1 Ligand Trap Reduces Microvascular Density and Improves Chemotherapy Efficiency to Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 22(1):96-106.
- Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P.** (2010). Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 70(10):4141-50.
- He X, Zhang L, Yao X, Hu J, Yu L, Jia H, An R, Liu Z, Xu Y.** (2013). Association Studies of MMP-9 in Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One.* 8(9): e73777.
- Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W.** (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 10(1):45-55.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390(6659):465-71.
- Heldin CH.** (2008). TGF-beta signaling from receptors to Smads. *The TGF-b Family (2008, Volume 50).* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 259-85.
- Henriksen R, Gobl A, Wilander E, Oberg K, Miyazono K, Funa K.** (1995). Expression and prognostic significance of TGF-b isotypes, latent TGF-b1 binding protein, TGF-b type I and typeII receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest.* 73(2):213-20.
- Herbert SP, Stainier DY.** (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(9):551-64.
- Hiraoka N, Allen E, Apel JJ.** (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell.* 95 pp. 365-377.
- Horstmann S, Budig L, Gardner H, Koziol J, Deuschle M, Schilling C, Wagner S.** (2010). Matrix metalloproteinases in peripheral blood and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr.* 22(6):966-72.
- Hosman A, Westermann CJ, Snijder R, Disch F, Mummery CL, Mager JJ.** (2015). Follow-up of Thalidomide treatment in patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Rhinology.* 53(4):340-4.

- Houard X, Monnot C, Dive V, Corvol P, Pagano M.** (2003). Vascular smooth muscle cells efficiently activate a new proteinase cascade involving plasminogen and fibronectin. *J Cell Biochem.* 88(6):1188-201.
- Huang X, Li X, Guo B.** (2008). KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. *J Biol Chem.* 283(44):29795-801.
- Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J.** (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell.* 96(3):425-36.
- Ikemoto T, Hojo Y, Kondo H, Takahashi N, Hirose M, Nishimura Y, Katsuki T, Shimada K, Kario K.** (2012). Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels.* 27(4):344-51.
- Ito G, Uchiyama M, Kondo M, Mori S, Usami N, Maeda O, Kawabe T, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y.** (2004). Krüppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 64(11):3838-43.
- Itoh Y, Ito N, Nagase H, Evans RD, Bird SA, Seiki M.** (2006). Cell surface collagenolysis requires homodimerization of the membrane-bound collagenase MT1-MMP. *Mol Biol Cell.* 17(12):5390-9.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J. & ten Dijke, P.** (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* 267(24):6954-67.
- Izumiyama Y, Ohiro Y, Higashino F, Yoshida K, Taguchi K, Todo S, Kohgo T, Totsuka Y, Shindoh M.** (2005). E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters. *Oncol Rep.* 13(4):715-20.
- Jackson MT, Moradi B, Smith MM, Jackson CJ, Little CB.** (2014). Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 66(6):1525-36.
- Janknecht R, Wells NJ, Hunter T.** (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.* 12:2114-2119.
- Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D.** (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;88(12):5096-100.
- Jerkic M, Letarte M.** (2015). Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. *FASEB J.* 29(9):3678-88.
- Jerkic M, Rodríguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, Pérez-Barriocanal F, Arévalo M, Bernabéu C, Letarte M, López-Novoa JM.** (2006). Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res.* 69(4):845-54.
- Jezkova K, Rathouska J, Nemeckova I, Fikrova P, Dolezelova E, Varejckova M, Vitverova B, Tysonova K, Serwaczak A, Buczek E, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P.** (2016). High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet. *J Vasc Res.* 53(3-4):149-162.
- Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH.** (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 10(3):353-60.

- Jimeno A, Posner MR, Wirth LJ, Saba NF, Cohen RB, Popa EC, Argiris A, Grossmann KF, Sukari A, Wilson D, Zhang X, Sun J, Glasser C, Attie KM, Sherman ML, Pandya SS, Weiss J.** (2016). A phase 2 study of dalantercept, an activin receptor-like kinase-1 ligand trap, in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 122(23):3641-3649.
- Jin SW, Patterson C.** (2009). The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29(5): 623–629.
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA.** (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet*. 13(2):189-95.
- Johnson JL, Jenkins NP, Huang WC, Di Gregoli K, Sala-Newby GB, Scholtes VP, Moll FL, Pasterkamp G, Newby AC.** (2014). Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. *Mediators Inflamm*. 2014:276457.
- Johnson JL, Pillai S, Pernazza D, Sebti SM, Lawrence NJ, Chellappan SP.** (2012). Regulation of matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease. *Cancer Res*. 72(2):516-26.
- Jones L.** (2001). Stem cells: so what's in a niche?. *Curr Biol*. 11(12):R484-6.
- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K.** (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(4):257-67.
- Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM.** (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem*. 74:83-114.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R.** (2003). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol*. 4(2):206.
- Kapur NK, Morine KJ, Letarte M.** (2013). Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:195-206.
- Karam JA, Svatek RS, Karakiewicz PI, Gallina A, Roehrborn CG, Slawin KM, Shariat SF.** (2008). Use of preoperative plasma endoglin for prediction of lymph node metastasis in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 14(5):1418-22.
- Karampoor S, Zahednasab H, Ramagopalan S, Mehrpour M, Keyvani H.** (2016). Angiogenic factors are associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 301:88-93.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H.** (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*. 126:4895–902.
- Kelly EE, Horgan CP, McCaffrey MW.** (2012). Rab11 proteins in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 1;40(6):1360-7.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z.** (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141(1):52-67.
- Khokha R, Murthy A, Weiss A.** (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 13(9):649-65.

- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I.** (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 93(10):1049-59.
- Kim IY, Zelner DJ, Lee C.** (1998). The conventional transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor type I is not required for TGF-beta 1 signaling in a human prostate cancer cell line, LNCaP. *Exp Cell Res.* 241(1):151-60.
- Kim J, Kim M, Jeong Y, Lee WB, Park H, Kwon JY, Kim YM, Hwang D, Kwon YG.** (2015). BMP9 Induces Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cell Differentiation and Ischemic Neovascularization via ALK1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35(9):2020-31.
- Klein T, Bischoff R.** (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 41(2):271-90.
- Koch AE.** (2003). Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 62 Suppl 2:ii60-7.
- Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL.** (2000). Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood.* 95(4):1309-16.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, Vary CP.** (2006). Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem.* 281(35):25110-23.
- Koritschoner NP, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, Dumur CI, Flury A, Patrino LC.** (1997). A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem.* 272(14):9573-80.
- Kozioł A, Gonzalo P, Mota A, Pollán Á, Lorenzo C, Colomé N, Montaner D, Dopazo J, Arribas J, Canals F, Arroyo AG.** (2012). The protease MT1-MMP drives a combinatorial proteolytic program in activated endothelial cells. *FASEB J.* 26(11):4481-94.
- Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN.** (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 37(9):11553-11572.
- Kuo, C. T., Veselits, M. L., Barton, K. P., Lu, M. M., Clendenin, C. y Leiden, J. M.** (1997). The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev.* 11, 2996-3006.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG.** (2003). Angiogenesis and Vascular Remodeling by Intussusception: From Form to Function. *News Physiol Sci.* 18:65-70.
- Lähteenvuo J, Rosenzweig A.** (2012). Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res.* 110(9): 1252–1264.
- Lalazar A, Wong L, Yamasaki G, Friedman SL.** (1997). Early genes induced in hepatic stellate cells during wound healing. *Gene.* 195(2):235-43.
- Lam C, Lim KH, Karumanchi SA.** (2005). Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension.* 46(5):1077-85.
- Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E.** (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 49(3):187-98.

- Lan HY.** (2011). Diverse roles of TGF- $\beta$ /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 7(7):1056-67.
- Lastres P, Bellon T, Cabañas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C.** (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol.* 22(2):393-7.
- Lastres P, Martín-Perez J, Langa C, Bernabéu C.** (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J.* 301 ( Pt 3):765-8.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P.** (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23(20):4018-28.
- Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, Bréant C, Mathivet T, Larrivée B, Thomas JL, Arthur HM, Westermann CJ, Disch F, Mager JJ, Snijder RJ, Eichmann A, Mummery CL.** (2010). Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med.* 16(4):420-8.
- Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R.** (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* 26(17):3957-67.
- Lee NY, Blobe GC.** (2007). The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J Biol Chem.* 282(29):21507-17.
- Lee NY, Golzio C, Gatza CE, Sharma A, Katsanis N, Blobe GC.** (2012). Endoglin regulates PI3-kinase/Akt trafficking and signaling to alter endothelial capillary stability during angiogenesis. *Mol Biol Cell.* 23(13):2412-23.
- Letamendía A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C.** (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* 273(49):33011-9.
- Letarte M, Greaves A, Vera S.** (1995). CD105 (Endoglin) Cluster Report: Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. *Oxford, UK, Oxford University Press.* pp 1756–1759.
- Letarte, M., McDonald, M.L., Li, C., Kathirkamathamby, K., Vera, S., Pece-Barbara, N. and Kumar, S.** (2005). Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res*, 68, 155-164.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group.** (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 355(10):992-1005.
- Li C, Guo B, Ding S, Rius C, Langa C, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S.** (2003). TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res.* 23(2B):1189-96.
- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S.** (2000). Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 89: 122–126.
- Li D, Yea S, Li S, Chen Z, Narla G, Banck M, Laborda J, Tan S, Friedman JM, Friedman SL, Walsh MJ.** (2005). Krüppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem.* 280(29):26941-52.



- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP.** (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 284(5419):1534-7.
- Li W, Salmon RM, Jiang H, Morrell NW.** (2016). Regulation of the ALK1 ligands, BMP9 and BMP10. *Biochem Soc Trans*. 15;44(4):1135-41.
- Li WY, Li FM, Zhou YF, Wen ZM, Ma J, Ya K, Qian ZM.** (2016). Aspirin down Regulates Hecpudin by Inhibiting NF- $\kappa$ B and IL6/JAK2/STAT3 Pathways in BV-2 Microglial Cells Treated with Lipopolysaccharide. *Int J Mol Sci*. 17(12).
- Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, Lian JB, Stein GS.** (2008). A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(37):13906-11.
- Libermann TA, Baltimore D.** (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol*. 10(5):2327-34.
- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C, Bergan RC.** (2002). Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene*. 21(54):8272-81.
- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C.** (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol*. 365(3):694-705.
- Löf A, Müller JP, Brehm MA.** (2017). A Biophysical View on von Willebrand Factor Activation. *J Cell Physiol*. 2017 Mar 3.
- López-Novoa JM, Bernabeu C.** (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 299(4):H959-74.
- López-Otín C, Palavalli LH, Samuels Y.** (2009). Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle*. 15;8(22):3657-62.
- Lu H, Hu L, Yu L, Wang X, Urvalek AM, Li T, Shen C, Mukherjee D, Lahiri SK, Wason MS, Zhao J.** (2014). KLF8 and FAK cooperatively enrich the active MMP14 on the cell surface required for the metastatic progression of breast cancer. *Oncogene*. 33(22):2909-17.
- Lux A, Salway F, Dressman HK, Kröner-Lux G, Hafner M, Day PJ, Marchuk DA, Garland J.** (2006). ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc Disord*. 6:13.
- Lux A, Attisano L, Marchuk DA.** (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem*. 9;274(15):9984-92.
- Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M, O'Brien E.** (2000). Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(12):2546-52.
- Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M, Arthur HM.** (2010). Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res*. 106(8):1425-1433.

- Mahmoud M, Borthwick GM, Hislop AA, Arthur HM.** (2009). Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH. *Lab Invest.* 89(1):15-25.
- Mahmoud M, Upton PD, Arthur HM.** (2011). Angiogenesis regulation by TGF $\beta$  signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochem Soc Trans.* 39(6):1659-66.
- Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG.** (2009). Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis.* 12(2):113-23.
- Mancini ML, Verdi JM, Conley BA, Nicola T, Spicer DB, Oxburgh LH, Vary CP.** (2007). Endoglin is required for myogenic differentiation potential of neural crest stem cells. *Dev Biol.* 308(2):520-33.
- Marazuela M, Sánchez-Madrid F, Acevedo A, Larrañaga E, de Landázuri MO.** (1995). Expression of vascular adhesion molecules on human endothelial in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol.* 102(2):328-34.
- Martin A, Komada MR, Sane DC.** (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev.* 23(2):117-45.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19(23):2783-810.
- Massagué J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-91.
- Massagué J.** (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(10):616-30.
- Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M.** (2000). Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke.* 31(11):2653-60.
- Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL.** (2006). Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood.* 107(4):1357-65.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al.** (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 8(4):345-51.
- McConnell BB, Yang VW.** (2010). Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev.* 90(4):1337-81.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA.** (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1773(8):1263-84.
- McDonald J, Damjanovich K, Millson A, Wooderchak W, Chibuk JM, Stevenson DA, Gedge F, Bayrak-Toydemir P.** (2011). Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis. *Clin Genet.* 79(4):335-44.
- McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P.** (2015). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet.* 6:1.
- Mejía-Rangel J, Córdova E, Orozco L, Ventura-Gallegos JL, Mitre-Aguilar I, Escalona-Guzmán A, Vadillo F, Vázquez-Prado J, Gariglio P, Zentella-Dehesa A.** (2016). Pro-adhesive phenotype of normal



endothelial cells responding to metastatic breast cancer cell conditioned medium is linked to NF $\kappa$ B-mediated transcriptomic regulation. *Int J Oncol.* 49(5):2173-2185.

**Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R.** (2005). Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem.* 280(4):3078-87.

**Michiels C.** (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 196(3):430-43.

**Migliacci R, Becattini C, Pesavento R, Davi G, Vedovati MC, Guglielmini G, Falcinelli E, Ciabattoni G, Dalla Valle F, Prandoni P, Agnelli G, Gresele P.** (2007). Endothelial dysfunction in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Haematologica.* 92(6):812-8.

**Miller IJ, Bieker JJ.** (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 13(5):2776-86.

**Mitchell D, Pobre EG, Mulivor AW, Grinberg AV, Castonguay R, Monnell TE, Solban N, Ucran JA, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R.** (2010). ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 9(2):379-88.

**Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, Grati M, Mittal J, Yan D, Chapagain P, Liu XZ.** (2016). Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol.* 231(12):2599-621.

**Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M.** (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 147(1):35-51.

**Monvoisin A, Alva JA, Hofmann JJ, Zovein AC, Lane TF, Iruela-Arispe ML.** (2006). VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Dev Dyn.* 235(12):3413-22.

**Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH.** (2013). Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene.* 32(13):1609-15.

**Moser J, van Ark J, van Dijk MC, Greiner DL, Shultz LD, van Goor H, Hillebrands JL.** (2016). Distinct Differences on Neointima Formation in Immunodeficient and Humanized Mice after Carotid or Femoral Arterial Injury. *Sci Rep.* 6:35387.

**Mott JD, Werb Z.** (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 16(5):558-64.

**Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Kumar RM, Bilodeau S, Reddy J, Guenther MG, DeKoter RP, Young RA.** (2011). Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- $\beta$  signaling. *Cell.* 147(3):565-76.

**Murphy G.** (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 11;12(11):233.

**Mysliwiec P, Pawlak K, Bandurski R, Kedra B.** (2009). Soluble angiogenesis markers in gastric tumor patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 47(1):81-6.

**Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z.** (2012). The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 224(1):4-11.

**Nagase H.** (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 378(3-4):151-60.

- Nalluri S, Ghoshal-Gupta S, Kutiyawalla A, Gayatri S, Lee BR, Jiwani S, Rojiani AM, Rojiani MV.** (2015). TIMP-1 Inhibits Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cells via Interaction with Bcl-2. *PLoS One*. 14;10(9):e0137673.
- Nandan MO, Yang VW.** (2009). The role of Krüppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Histol Histopathol*. 24(10):1343-55.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL.** (2001). KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science*. 294(5551):2563-6.
- Nasrallah R, Knezevic K, Thai T, Thomas SR, Göttgens B, Lacaud G, Kouskoff V, Pimanda JE.** (2015). Endoglin potentiates nitric oxide synthesis to enhance definitive hematopoiesis. *Biol Open*. 15;4(7):819-29.
- Nemeckova I, Serwaczak A, Oujo B, Jezkova K, Rathouska J, Fikrova P, Varejckova M, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P.** (2015). High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One*. 10(3):e0119665.
- Nistala H, Lee-Arteaga S, Smaldone S, Siciliano G, Carta L, Ono RN, Sengle G, Arteaga-Solis E, Levasseur R, Ducy P, Sakai LY, Karsenty G, Ramirez F.** (2010). Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- $\beta$  and BMP bioavailability during bone formation. *J Cell Biol*. 20;190(6):1107-21.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO.** (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*. 16(3):291-9.
- Nolan-Stevaux O, Zhong W, Culp S, Shaffer K, Hoover J, Wickramasinghe D, Ruefli-Brasse A.** (2012). Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. *PLoS One*. 7(12):e50920.
- Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F.** (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature*. 375(6529):316-8.
- Núñez-Gómez E, Pericacho M, Ollauri-Ibáñez C, Bernabéu C, López-Novoa JM.** (2017). The role of endoglin in post-ischemic revascularization. *Angiogenesis*. 20(1):1-24.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 30;287(5785):795-801.
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fisicaro N, Rockman SP, Pearse MJ, d'Apice AJ.** (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol*. 90(1):154-9.
- Odegaard E, Davidson B, Engh V, Onsrud M, Staff AC.** (2008). Assessment of endoglin and calprotectin as potential biomarkers in ovarian carcinoma and borderline tumors of the ovary. *Am J Obstet Gynecol*. 199(5):533.e1-8.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E.** (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(6):2626-31.
- Ojeda-Fernandez L, Barrios L, Rodriguez-Barbero A, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM.** (2010). Reduced plasma levels of Ang-2 and sEng as novel biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Clin Chim Acta*. 411(7-8):494-9.

- Ojeda-Fernández L, Recio-Poveda L, Aristorena M, Lastres P, Blanco FJ, Sanz-Rodríguez F, Gallardo-Vara E, de las Casas-Engel M, Corbí Á, Arthur HM, Bernabeu C, Botella LM. (2016). Mice Lacking Endoglin in Macrophages Show an Impaired Immune Response. *PLoS Genet.* 12(3):e1005935.
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol.* 193(3):299-318.
- Oujo B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. (2013). Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Curr Mol Med.* 13(8):1345-57.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3):221-33.
- Pan CC, Kumar S, Shah N, Hoyt DG, Hawinkels LJ, Myhre K, Lee NY. (2014). Src-mediated post-translational regulation of endoglin stability and function is critical for angiogenesis. *J Biol. Chem.* 289(37):25486-96.
- Pap T, Müller-Ladner U, E Gay R, and Gay S. (2000). Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2(5): 361–367.
- Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C, Letarte M. (2001). Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum Mol Genet.* 10(13):1347-57.
- Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. (2010). Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* 20(9):556-67.
- Park JH, Choi MR, Park KS, Kim SH, Jung KH, Chai YG. (2012). The characterization of gene expression during mouse neural stem cell differentiation in vitro. *Neurosci Lett.* 506(1):50-4.
- Park S, Dimaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N. (2013). Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- $\beta$  signaling pathways. *J Cell Sci.* 15;126(Pt 6):1392-405.
- Parker WL, Goldring MB, Philip A. (2003). Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner. *J Bone Miner Res.* 18(2):289-302.
- Patel-Hett S, D'Amore PA. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 55(4-5):353-63.
- Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M, Bao S. (2008). Krüppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(10):1996-2001.
- Pece N, Vera S, Cymerman U, White RI Jr, Wrana JL, Letarte M. (1997). Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest.* 100(10):2568-79.
- Pece-Barbara N, Cymerman U, Vera S, Marchuk DA, Letarte M. (1999). Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum Mol Genet.* 8(12):2171-81.

- Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R.** (1993). Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res.* 204(2):356-63.
- Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabéu C, Quintanilla M.** (2005). Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene.* 24(27):4450-61.
- Pérez-Gómez E, Villa-Morales M, Santos J, Fernández-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J, Bernabéu C, Quintanilla M.** (2007). A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 67(21):10268-77.
- Perlingeiro RC.** (2007). Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. *Development.* 134(16):3041-8.
- Phng LK, Gerhardt H.** (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell.* 16(2):196-208.
- Piazza M, Dieckmann T, Guillemette JG.** (2016). Structural Studies of a Complex Between Endothelial Nitric Oxide Synthase and Calmodulin at Physiological Calcium Concentration. *Biochemistry.* 55 (42), pp 5962–5971.
- Poggesi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D.** (2016). Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: A review. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(1):72-94.
- Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM.** (2001). The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn.* 220(1):1-17.
- Prandoni P, Piovello C, Pesavento R.** (2012). Venous thromboembolism and arterial complications. *Semin Respir Crit Care Med.* 33(2):205-10.
- Preiss A, Rosenberg UB, Kienlin A, Seifert E, Jäckle H.** (1985). Molecular genetics of Krüppel, a gene required for segmentation of the Drosophila embryo. *Nature.* 313(5997):27-32.
- Pries AR, Kuebler WM.** (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 176 Pt 1:1-40.
- Qu R, Silver MM, Letarte M.** (1998). Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res.* 292:333–343.
- Quackenbush EJ, Gougos A, Bauml R, Letarte M.** (1986). Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol.* 136 (1) 118-124.
- Quackenbush EJ, Letarte M.** (1985). Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol.* 134(2):1276-85.
- Quintanilla M, Ramirez JR, Pérez-Gómez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, López-Novoa JM, Bernabéu C.** (2003). Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene.* 22(38):5976-85.
- Rathouska J, Fikrova P, Mrkvicova A, Blazickova K, Varejckova M, Dolezelova E, Nemeckova I, Vitverova B, Peslova L, Gallardo-Vara E, Pericacho M, Nachtigal P.** (2017). High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart. *Heart Vessels.*
- Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P.** (2015). Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.* 243(2):383-8.

- Ratzliff V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL.** (1998). Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(16):9500-5.
- Ray BK, Shakya A, Turk JR, Apte SS, Ray A.** (2004). Induction of the MMP-14 gene in macrophages of the atherosclerotic plaque: role of SAF-1 in the induction process. *Circ Res*. 95(11):1082-90.
- Reiss M, Barcellos-Hoff MH.** (1997). Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis. *Breast Cancer Res Treat*. 45(1):81-95.
- Ren W, Liu Y, Wan S, Fei C, Wang W, Chen <sup>2</sup>, Zhang Z, Wang T, Wang J, Zhou L, Weng Y, He T, Zhang Y.** (2014). BMP9 inhibits proliferation and metastasis of HER2-positive SK-BR-3 breast cancer cells through ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. *PLoS One*. 9(5):e96816.
- Risau W.** (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386(6626):671-4.
- Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabeu C, Sánchez-Madrid F, Teixidó J.** (1996). Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol*. 93(3):507-14.
- Rodríguez-Barbero A, Obreo J, Eleno N, Rodríguez-Peña A, Düwel A, Jerkic M, Sánchez-Rodríguez A, Bernabéu C, López-Novoa JM.** (2001). Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun*. 282(1):142-7.
- Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED.** (2000). Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(2):335-42.
- Rossant J, Howard L.** (2002). Signaling pathways in vascular development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 18:541-73.
- Rossi E, Sanz-Rodríguez F, Eleno N, Düwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabañas C, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C.** (2013). Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*. 121(2):403-15.
- Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, Langa C, Arevalo MA, Pericacho M, Gamella-Pozuelo L, Kauskot A, Botella LM, Gaussem P, Bischoff J, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C.** (2016). Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci*. 73(8):1715-39.
- Roy R, Zhang B, Moses MA.** (2006). Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp Cell Res*. 10;312(5):608-22.
- Ruiz S, Zhao H, Chandakkar P, Chatterjee PK, Papoin J, Blanc , Metz CN, Campagne F, Marambaud P.** (2016). A mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia generated by transmammary-delivered immunoblocking of BMP9 and BMP10. *Sci Rep*. 5:37366.
- Rundhaug JE.** (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 9(2):267-85.
- Sadick H, Riedel F, Naim R, Goessler U, Hörmann K, Hafner M, Lux A.** (2005). Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica*. 90(6):818-28.

- Sadick, H., Sadick, M., Gotte, K., Naim, R., Riedel, F., Bran, G. and Hormann, K.** (2006). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on clinical manifestations and diagnostic measures. *Wien Klin Wochenschr*, 118, 72-80.
- Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C.** (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 15;277(46):43799-808.
- Sangwung P, Zhou G, Nayak L, Chan ER, Kumar S, Kang DW, Zhang R, Liao X, Lu Y, Sugi K, Fujioka H, Shi H, Lapping SD, Ghosh CC, Higgins SJ, Parikh SM, Jo H, Jain MK.** (2017). KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight*. 2(4):e91700.
- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C.** (2011). TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 121(6):233-51.
- Santibañez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C.** (2007). Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol*. 210(2):456-68.
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabéu C.** (2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem*. 279(31):32858-68.
- Sato TN, Loughna S, Davis EC, Visconti RP, Richardson CD.** (2002). Selective functions of angiopoietins and vascular endothelial growth factor on blood vessels: the concept of "vascular domain". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 67:171-80.
- Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Löwik CW, ten Dijke P.** (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 120(Pt 6):964-72.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 9(7):676-682.
- Schlundt C, Schell H, Goodman SB, Vunjak-Novakovic G, Duda GN, Schmidt-Bleek K.** (2015). Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *J Exp Orthop*. 2(1):1.
- Schmidt A, Brixius K, Bloch W.** (2007). Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res*. 101(2) 125–36.
- Schmierer B, Hill CS.** (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(12):970-82.
- Schneider C.A, Rasband W.S, Eliceiri K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 9(7):671-675.
- Semenza GL.** (2007). Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem*. 102(4):840-7.
- Sheppard D.** (2005). Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev*. 24(3):395-402.

- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP.** (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 92, 362-7.
- Shi Y, Massagué J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113(6):685-700.
- Shoji M, Koba S, Kobayashi Y.** (2014). Roles of bone-marrow-derived cells and inflammatory cytokines in neointimal hyperplasia after vascular injury. *Biomed Res Int*. 2014:945127.
- Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG.** (1997). Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*. 61(1):68-79.
- Shovlin CL.** (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev*. 24(6):203-19.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M.** (2005). Pre-eclampsia. *Lancet*. 365(9461):785-99.
- Sobczak M, Dargatz J, Chrzanowska-Wodnicka M.** (2010). Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *J Vis Exp*. 14;(46).
- Steinberg G, Khankin EV, Karumanchi SA.** (2009). Angiogenic factors and preeclampsia. *Thromb Res*. 123 Suppl 2:S93-9.
- Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W.** (2006). Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets*. 7(8):923-34.
- Stenvers KL, Findlay JK.** (2010). Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab*. 21(3):174-80.
- Stetler-Stevenson WG.** (2008a). The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev*. 27(1):57-66.
- Stetler-Stevenson WG.** (2008b). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal*. 1(27):re6.
- St-Jacques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M.** (1994b). Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod*. 51(3):405-13.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M.** (1994a). Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology*. 134(6):2645-57.
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A.** (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 34(12):1508-12.
- Suske G, Bruford E, Philipsen S.** (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics*. 85(5):551-6.
- Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R.** (2005). Vascular implications of the Krüppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(6):1135-41.



**Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T.** (2010). BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci.* 123(Pt 10):1684-92.

**Tabruyn SP, Hansen S, Ojeda-Fernández ML, Bovy N, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Bernabéu C, Martial JA, Botella LM, Struman I.** (2013). MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF-beta signaling pathways in endothelial cells. *Angiogenesis.* 16(4):877-87.

**Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK.** (2001a). Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res.* 7(3):524-32.

**Telugu BP, Adachi K, Schlitt JM, Ezashi T, Schust DJ, Roberts RM, Schulz LC.** (2013). Comparison of extravillous trophoblast cells derived from human embryonic stem cells and from first trimester human placentas. *Placenta.* 34(7):536-43.

**ten Dijke P, Arthur HM.** (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(11):857-69.

**ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S.** (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol.* 191(1):1-16.

**ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E.** (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis.* 11(1):79-89.

**ten Dijke P, Korchynskyi O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ.** (2003). Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 211(1-2):105-13.

**Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC.** (2005). Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood.* 105(3):1068-77.

**Thurston G, Kitajewski J.** (2008). VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br J Cancer.* 99(8):1204-9.

**Tillet E, Bailly S.** (2015). Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet.* 5:456.

**Tobar N, Avalos MC, Méndez N, Smith PC, Bernabeu C, Quintanilla M, Martínez J.** (2014). Soluble MMP-14 produced by bone marrow-derived stromal cells sheds epithelial endoglin modulating the migratory properties of human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 35(8):1770-9.

**Tokito A, Jougasaki M.** (2016). Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders. *Int J Mol Sci.* 21;17(7). pii: E1178.

**Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW.** (2010). Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res.* 79(3):200-6.

**Torsney E, Charlton R, Diamond AG, Burn J, Soames JV, Arthur HM.** (2003). Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation.* 107(12):1653-7.

**Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM.** (2002). Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res.* 51(9):464-70.



- Trucco LD, Andreoli V, Núñez NG, Maccioni M, Bocco JL.** (2014). Krüppel-like factor 6 interferes with cellular transformation induced by the H-ras oncogene. *FASEB J.* 28(12):5262-76.
- Tse D, Stan RV.** (2010). Morphological heterogeneity of endothelium. *Semin Thromb Hemost.* 36(3):236-45.
- Tual-Chalot S, Allinson KR, Fruttiger M, Arthur HM.** (2013). Whole mount immunofluorescent staining of the neonatal mouse retina to investigate angiogenesis in vivo. *J Vis Exp.* 9(77):e50546.
- Tual-Chalot S, Oh SP, Arthur HM.** (2015). Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges. *Front Genet.* 6:25.
- Upton PD, Davies RJ, Trembath RC, Morrell NW.** (2009). Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem.* 284(23):15794-804.
- Valacca C, Tassone E, Mignatti P.** (2015). TIMP-2 Interaction with MT1-MMP Activates the AKT Pathway and Protects Tumor Cells from Apoptosis. *PLoS One.* 2;10(9):e0136797.
- Valbuena-Díez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Núñez M, Llano E, Pendas AM, Díaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C.** (2012). Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation.* 126(22):2612-24.
- Valcourt U, Carthy J, Okita Y, Alcaraz L, Kato M, Thuault S, Bartholin L, Moustakas A.** (2016). Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Methods Mol Biol.* 1344:147-81.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P.** (2006). Smad7 and protein phosphatase 1 $\alpha$  are critical determinants in the duration of TGF- $\beta$ /ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 7:16.
- Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ.** (2011). Transforming Growth Factor- $\beta$  and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Front Physiol.* 2:89.
- van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM, De Jong EM.** (1998). Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol.* 78(1):19-21.
- van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH.** (2006). Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(4):716-28.
- van Hinsbergh VW, Koolwijk P.** (2008). Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 78(2):203-12.
- van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F, Mummery CL.** (2006). Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation.* 114(21):2288-97.
- van Meeteren LA, Goumans MJ, ten Dijke P.** (2011). TGF- $\beta$  receptor signaling pathways in angiogenesis; emerging targets for anti-angiogenesis therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 12(12):2108-20.

**van Meeteren LA, ten Dijke P.** (2012). Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- $\beta$ . *Cell Tissue Res.* 347(1):177-86.

**Vandekeere S, Dewerchin M, Carmeliet P.** (2015). Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Microcirculation.* 22(7):509-17.

**Varejckova M, Gallardo-Vara E, Vicen M, Vitverova B, Fikrova P, Dolezelova E, Rathouska J, Prasnicka A, Blazickova K, Micuda S, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P.** (2017). Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- $\kappa$ B and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sci.* pii: S0024-3205(17)30097-8.

**Velasco S, Alvarez-Muñoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabéu C, López-Novoa JM, Rodríguez-Barbero A.** (2008). L- and S-endoglin differentially modulate TGF $\beta$ 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci.* 121(Pt 6):913-9.

**Velasco-Loyden G, Arribas J, López-Casillas F.** (2004). The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem.* 279(9):7721-33.

**Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA.** (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 12(6):642-9.

**Verma RP, Hansch C.** (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 15(6):2223-68.

**Vokes SA, Yatskievych TA, Heimark RL, McMahon J, McMahon AP, Antin PB, Kreig PA.** (2004). Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development.* 131(17):4371-80.

**Wacker A, Gerhardt H.** (2011). Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol.* 23(6):676-85.

**Wang J, Fu X, Yang K, Jiang Q, Chen Y, Jia J, Duan X, Wang EW, He J, Ran P, Zhong N, Semenza GL, Lu W.** (2015). Hypoxia inducible factor-1-dependent up-regulation of BMP4 mediates hypoxia-induced increase of TRPC expression in PASMCs. *Cardiovasc Res.* 107(1):108-18.

**Wang M, Hyuk Kim S, Monticone RE, Lakatta EG.** (2015) Matrix Metalloproteinases Promote Arterial Remodeling in Aging, Hypertension, and Atherosclerosis. *Hypertension.* 65(4): 698-703.

**Wang S, Kang L, Chen X, Zhou H.** (2010). Frequent down-regulation and deletion of KLF6 in primary hepatocellular carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 30(4):470-6.

**Wautier, J. L. y Schmidt, A. M.** (2004). Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res.* 95, 233-8.

**Weiss A, Attisano L.** (2013). The TGF $\beta$  superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2(1):47-63.

**Whitehead KJ, Sautter NB, McWilliams JP, Chakinala MM, Merlo CA, Johnson MH, James M, Everett EM, Clancy MS, Faughnan ME, Oh SP, Olitsky SE, Pyeritz RE, Gossage JR.** (2016). Effect of Topical

Intranasal Therapy on Epistaxis Frequency in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 316(9):943-51.

**Wierstra I.** (2008). Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 18;372(1):1-13.

**Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL, Young S, Plant P, Fülöp GT, Langa C, Morrell NW, Botella LM, Bernabeu C, Stevenson DA, Runo JR, Bayrak-Toydemir P.** (2013). BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*. 93(3):530-7.

**Wu J, Yu Z, Su D.** (2014). BMP4 Protects Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Apoptosis by PI3K/AKT/Smad1/5/8 Signaling. *Int J Mol Sci*. 15(8):13738-54.

**Wu LA, Wang F, Donly KJ, Baker A, Wan C, Luo D, MacDougall M, Chen S.** (2016) Establishment of Immortalized BMP2/4 Double Knock-Out Osteoblastic Cells Is Essential for Study of Osteoblast Growth, Differentiation, and Osteogenesis. *J Cell Physiol*. 231(6):1189-98.

**Xia P, Xu XY.** (2015). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res*. 5(5):1602-9.

**Xia WH, Chen L, Liang JW, Zhang XY, Su C, Tong X, He J, Li Y, Cao Z, Lin XF, Tao J.** (2017). BMP4/Id2 signaling pathway is a novel therapeutic target for late outgrowth endothelial progenitor cell-mediated endothelial injury repair. *Int J Cardiol*. 1;228:796-804.

**Xiao Z, Liu X, Lodish HF.** (2000). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem*. 275(31):23425-8.

**Xu L, Kang Y, Cöl S, Massagué J.** (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell*. 10(2):271-82.

**Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, Luo S, Zhuang L.** (2001). Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod*. 65(1):240-6.

**Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Morén A, ten Dijke P, Miyazono K.** Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 269(3):1995-2001.

**Yan Z, Wang ZG, Segev N, Hu S, Minshall RD, Dull RO, Zhang M, Malik AB, Hu G.** (2016). Rab11a Mediates Vascular Endothelial-Cadherin Recycling and Controls Endothelial Barrier Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2):339-49.

**Yana I, Sagara H, Takaki S, Takatsu K, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Taniguchi S, Aoki T, Sato H, Weiss SJ, Seiki M.** (2007). Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci*. 120(Pt 9):1607-14.

**Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 407 (6801): 242-248.

**Yang C, Zheng SD, Wu HJ, Chen SJ.** (2016). Regulatory Mechanisms of the Molecular Pathways in Fibrosis Induced by MicroRNAs. *Chin Med J (Engl)*. 129(19):2365-72.

- Yang X, Meyer K, Friedl A.** (2013). STAT5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promotes angiogenesis. *J Biol Chem.* 288(29):21184-96.
- Yang Y, Rosenberg GA.** (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* 1623:30-8.
- Yano, Kanellopoulos J, Kieran M, Le Bail O, Israel A, Kourilsky P.** (1987). Purification of KBF1, a common factor binding to both H-2 and b2-microglobulin enhancers. *EMBO J.* 6:3317.
- Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME.** (1998). Human EZF, a Krüppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem.* 273(2):1026-31.
- Yu L, Hébert MC, Zhang YE.** (2002). TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 21(14):3749-59.
- Yun S, Dardik A, Haga M, Yamashita A, Yamaguchi S, Koh Y, Madri JA, Sumpio BE.** (2002) Transcription factor Sp1 phosphorylation induced by shear stress inhibits membrane type 1-matrix metalloproteinase expression in endothelium. *J Biol Chem.* 277(38):34808-14.
- Yun S, Dardik A, Haga M, Yamashita A, Yamaguchi S, Koh Y, Madri JA, Sumpio BE.** (2002). Transcription factor Sp1 phosphorylation induced by shear stress inhibits membrane type 1-matrix metalloproteinase expression in endothelium. *J Biol Chem.* 277(38):34808-14.
- Zarrabeitia R, Ojeda-Fernandez L, Recio L, Bernabéu C, Parra JA, Albiñana V, Botella LM.** (2016). Bazedoxifene, a new orphan drug for the treatment of bleeding in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Tromb Haemost.* 2;115(6):1167-77.
- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE.** (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell.* 1(4):611-7.
- Zhang H, Shaw AR, Mak A, Letarte M.** (1996). Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol.* 156(2):564-73.
- Zhang Q, Tan XP, Yuan YS, Hu CM, He CH, Wang WZ, Li JC, Zhao Q, Liu NZ.** (2010). Decreased expression of KLF6 and its significance in gastric carcinoma. *Med Oncol.* 27(4):1295-302.
- Zhang Q, Kandic I, Faughnan ME, Kutryk MJ.** (2013). Elevated circulating microRNA-210 levels in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: a potential new biomarker. *Biomarkers.* 18(1):23-9.
- Zhao L, Wang J, Wang L, Liang YT, Chen YQ, Lu WJ, Zhou WL.** (2014). Remodeling of rat pulmonary artery induced by chronic smoking exposure. *J Thorac Dis.* 6(6):818-28.
- Zhao Y, Adjei AA.** (2015). Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist.* 20(6):660-73.
- Zhong J, Rajagopalan S.** (2015). Dipeptidyl Peptidase-4 Regulation of SDF-1/CXCR4 Axis: Implications for Cardiovascular Disease. *Front Immunol.* 6:477.
- Zhuang X, Cross D, Heath VL, Bicknell R.** (2011). Shear stress, tip cells and regulators of endothelial migration. *Biochem Soc Trans.* 39(6):1571-5.

**Zucco L, Zhang Q, Kuliszewski MA, Kandic I, Faughnan ME, Stewart DJ, Kutryk MJ.** (2014). Circulating angiogenic cell dysfunction in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *PLoS One*. 9(2):e89927.

# ***ANEXOS***

*El aprendizaje es experiencia,  
todo lo demás es información*

*(Albert Einstein)*



## VII. ANEXOS

### **ANEXO 1**

**Publicaciones surgidas del trabajo  
mostrado en esta tesis doctoral y  
colaboraciones durante su realización.**



## ANEXO 1

**El trabajo incluido en esta tesis doctoral, así como colaboraciones realizadas durante su realización, ha dado lugar a las siguientes publicaciones:**

1. **Gallardo-Vara E**, Blanco FJ, Roqué M, Friedman SL, Suzuki T, Botella LM, Bernabeu C. "Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury". *Angiogenesis*. 2016 Apr; 19(2):155-71.
2. Varejckova M<sup>1</sup>, **Gallardo-Vara E**<sup>1</sup>, Vicen M, Vitverova B, Fikrova P, Dolezelova E, Rathouska J, Prasnicka J, Blazickova K, Micuda S, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P. "Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- $\kappa$ B and IL-6 in cultured human endothelial cells". *Life Sci*. 2017 Mar; pii: S0024-3205(17)30097-8.
3. **Gallardo-Vara E**, Tual-Chalot S, Botella LM, Arthur HM, Bernabeu C. "Soluble endoglin decreases the generation of arteriovenous malformations in the retina of an HHT1 murine model by modulating the angiogenesis process". Manuscrito en preparación y autores aún por concretar.
4. Rathouska J, Fikrova P, Jezkova K, Dolezelova E, Nemeckova I, Vitverova B, Varejckova M, Mrkvicova A, **Gallardo-Vara E**, Pericacho M, Nachtigal P. "High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart". *Heart Vessels*. 2017 Apr.
5. Ojeda-Fernández L, Recio-Poveda L, Aristorena M, Lastres P, Blanco FJ, Sanz-Rodríguez F, **Gallardo-Vara E**, de las Casas-Engel M, Corbí Á, Arthur HM, Bernabeu C, Botella LM. "Mice Lacking Endoglin in Macrophages Show an Impaired Immune Response". *PLoS Genet*. 2016 Mar 24; 12(3):e1005935.
6. Blanco FJ, Ojeda-Fernandez L, Aristorena M, **Gallardo-Vara E**, Benguria A, Dopazo A, Langa C, Botella LM, Bernabeu C. "Genome-wide transcriptional and functional analysis of endoglin isoforms in the human promonocytic cell line U937". *J Cell Physiol*. 2015 Apr; 230(4):947-58.
7. Aristorena M, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, Ojeda-Fernandez L, **Gallardo-Vara E**, Corbi A, Botella LM, Bernabeu C. "Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization". *J Cell Sci*. 2014 Jun 15; 127(Pt 12):2723-35.

### **Otras publicaciones realizadas durante la etapa "final de carrera-máster".**

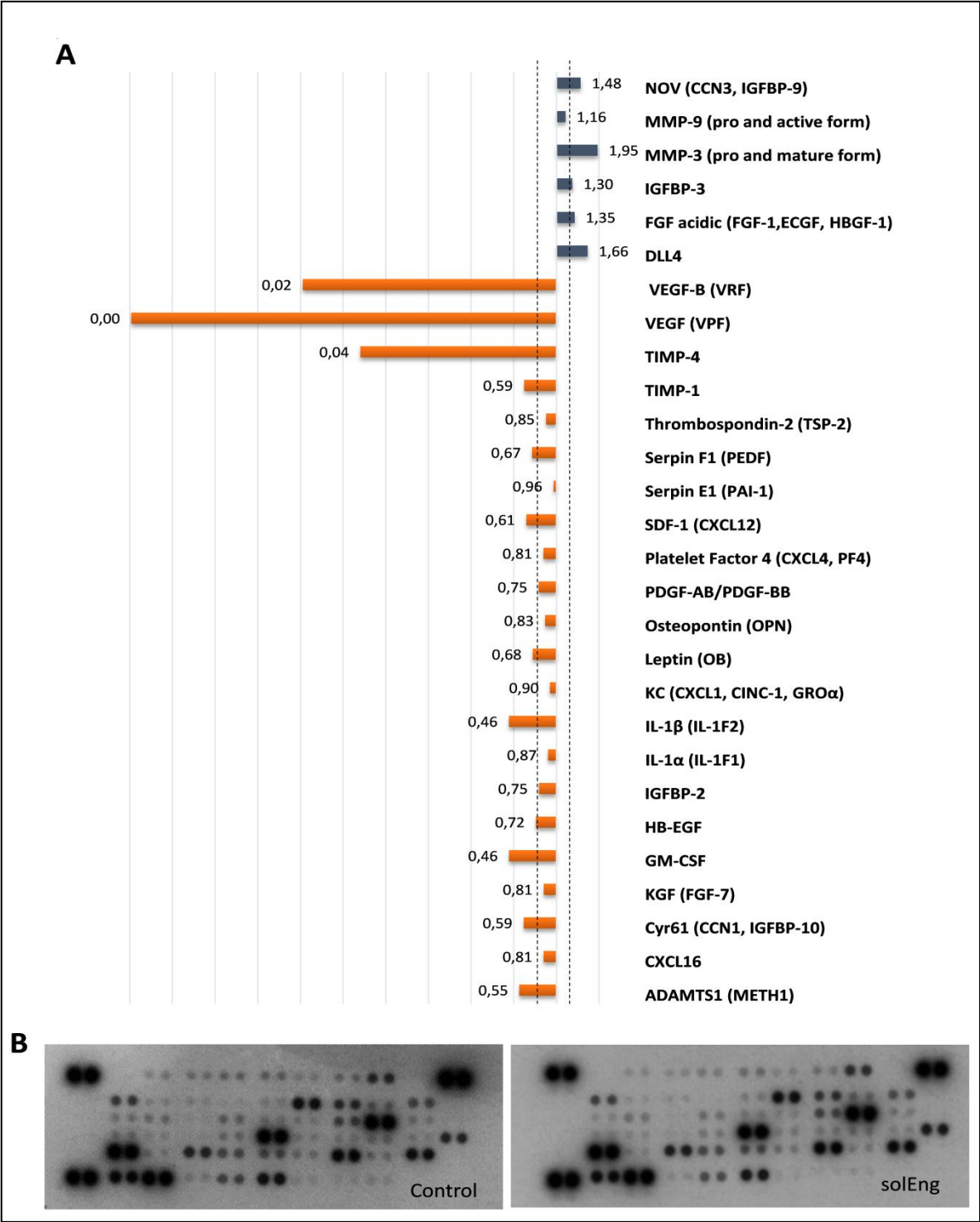
8. Gozález-Barroso MM, Anedda A, **Gallardo-Vara E**, Redondo-Horcajo M, Rodríguez-Sánchez L, Rial E. "Fatty acids revert the inhibition of respiration caused by the antidiabetic drug metformin to facilitate their mitochondrial  $\beta$ -oxidation". *Biochim Biophys Acta*. 2012 Oct; 1817(10):1768-75.
9. Rial E, Rodríguez-Sánchez L, Aller P, Guisado A, González-Barroso MM, **Gallardo-Vara E**, Redondo-Horcajo M, Castellanos E, Fernández de la Pradilla R, Viso A. "Development of chromanes as novel inhibitors of the uncoupling proteins". *Chem Biol*. 2011 Feb; 18(2):264-74.
9. Rial E, Rodríguez-Sánchez L, Aller P, **Gallardo-Vara E**, Zaragoza P, Moyano E, González-Barroso MM. "Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function". *Biochim Biophys Acta*. 2010 Feb; 1797(6-7):800-6.

## **ANEXO 2**

**Proteínas diferencialmente expresadas tras el análisis con un *array* angiogénico, de los sobrenadantes del cultivo primario de células endoteliales.**

ANEXO 2

MLEC1 tratadas con solEng 100ng/mL frente MLEC1 sin tratar (Control)



**A:** Se muestran las ratios o veces de inducción, en escala logarítmica, normalizadas frente a concentración de proteína, aumentadas (barras azules) o disminuidas (barras naranjas) en MLEC1 tratadas con 100ng/mL de solEng. Las líneas discontinuas indican una diferencia mayor o menor del 25%, a partir del cual los cambios se consideran significativos. **B:** Ejemplos de membranas del *dot blot* tras la incubación con sobrenadantes de MLEC1 tratadas con solEng y control (sin tratar).

### **ANEXOS 3,4,5,6 y 7**

**Proteínas diferencialmente expresadas tras el análisis con un *array* angiogénico, de los sobrenadantes del cultivo primario inmortalizado (línea celular) de células endoteliales de pulmón de ratón MLEC2.**

**En estos anexos se comparan diferentes condiciones entre sí:**

**Anexo 3: c-MLEC2 + solEng / c-MLEC2**

**Anexo 4: KO-MLEC2 / c-MLEC2**

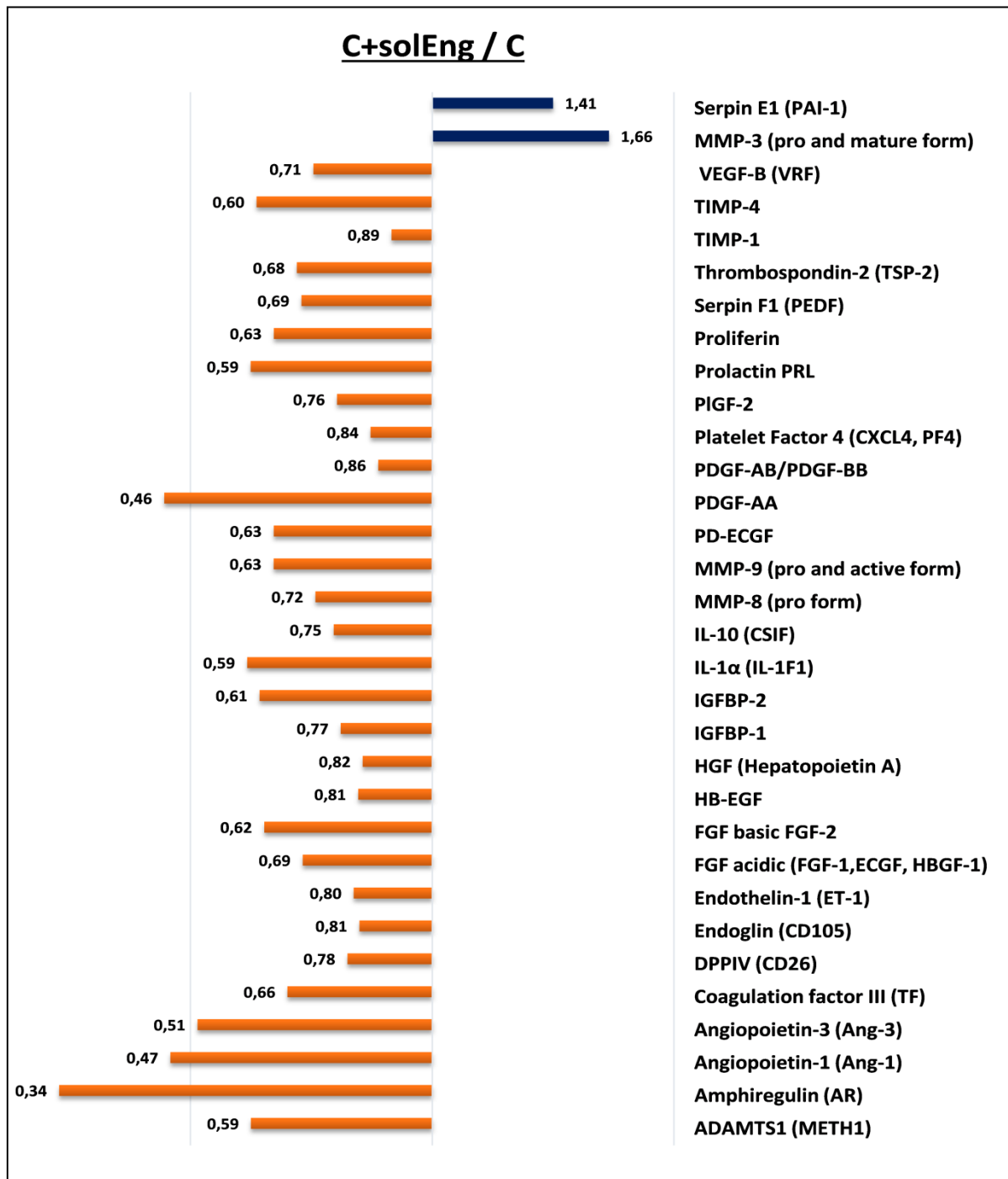
**Anexo 5: KO-MLEC2 + solEng / cMLEC2**

**Anexo 6: KO-MLEC2 + solEng / KO-MLEC2**

**Anexo 7: KO-MLEC2 + solEng / cMLEC2 + solEng**

### ANEXO 3

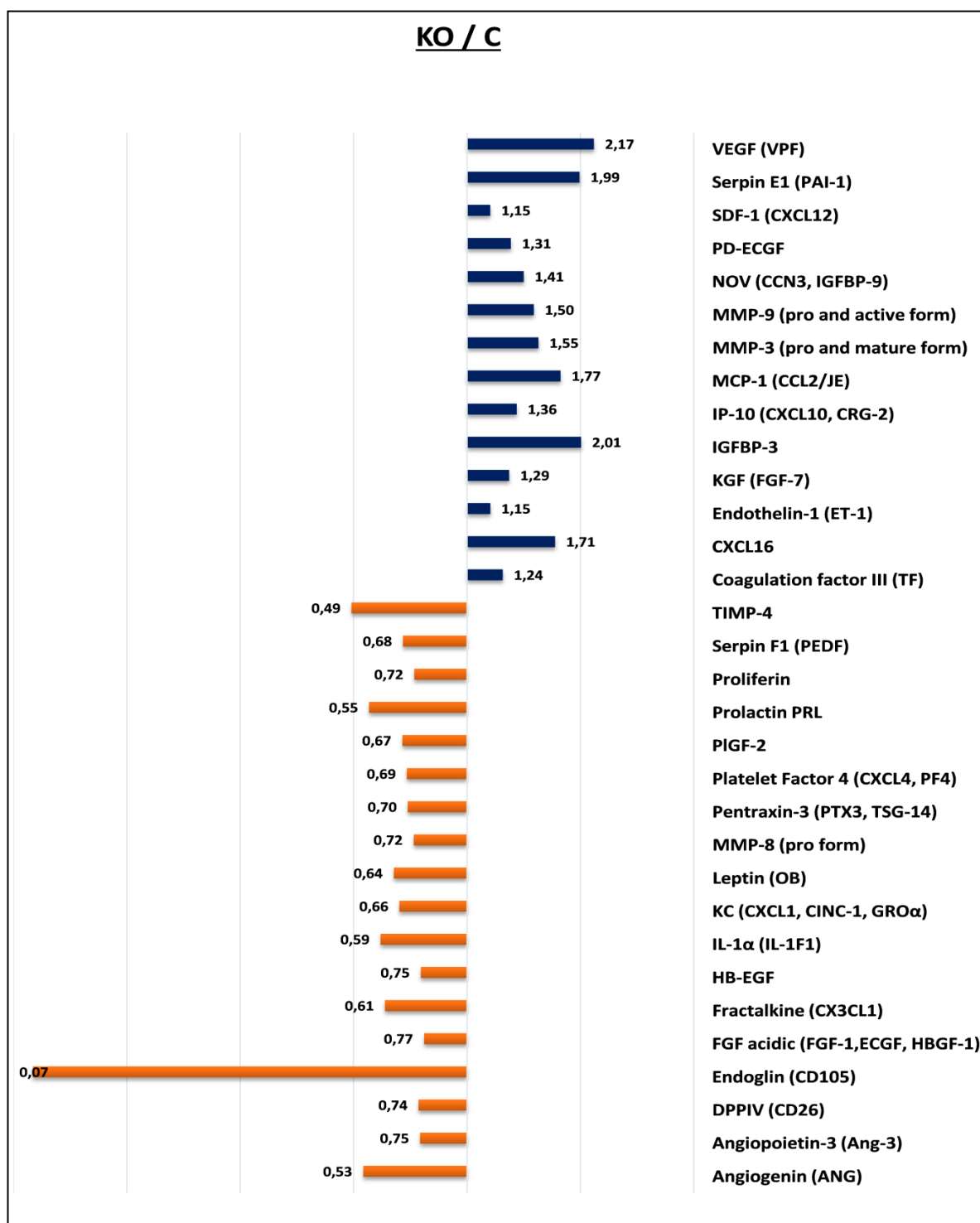
#### c-MLEC2 tratadas con solEng 100ng/mL frente c-MLEC2 sin tratar (Control)



Se muestran los ratios o veces de inducción, en escala logarítmica, normalizadas frente a concentración de proteína, aumentadas (barras azules) o disminuidas (barras naranjas) en c-MLEC2 tratadas con 100ng/mL de solEng. A partir de un 25% de inducción (>1,25) o de represión (<0,75) se pueden considerar diferencias significativas.

## ANEXO 4

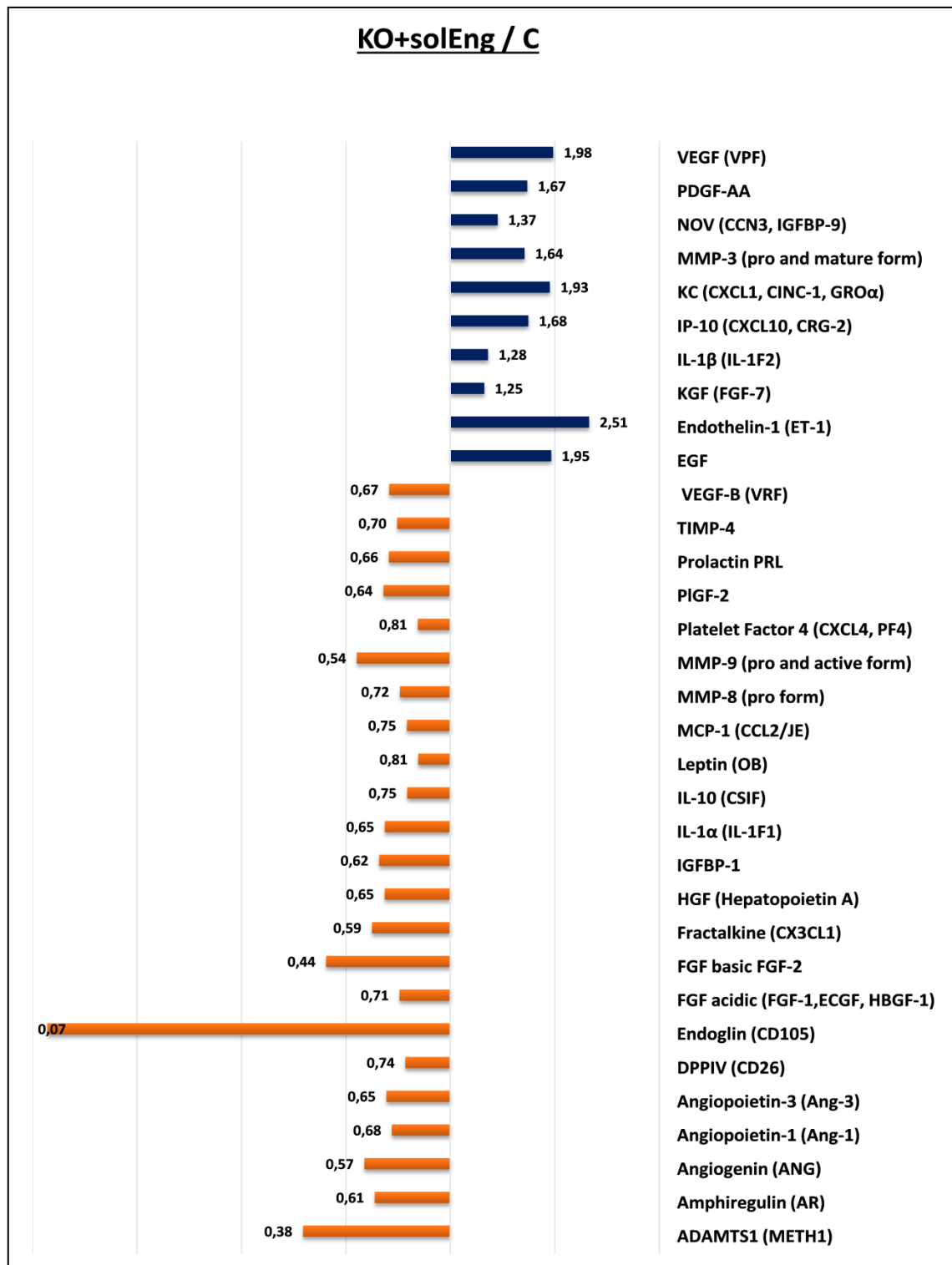
### KO-MLEC2 frente c-MLEC2 (Control)



Se muestran los ratios o veces de inducción, en escala logarítmica, normalizadas frente a concentración de proteína, aumentadas (barras azules) o disminuidas (barras naranjas) en KO-MLEC2. A partir de un 25% de inducción (>1,25) o de represión (<0,75) se pueden considerar diferencias significativas.

## ANEXO 5

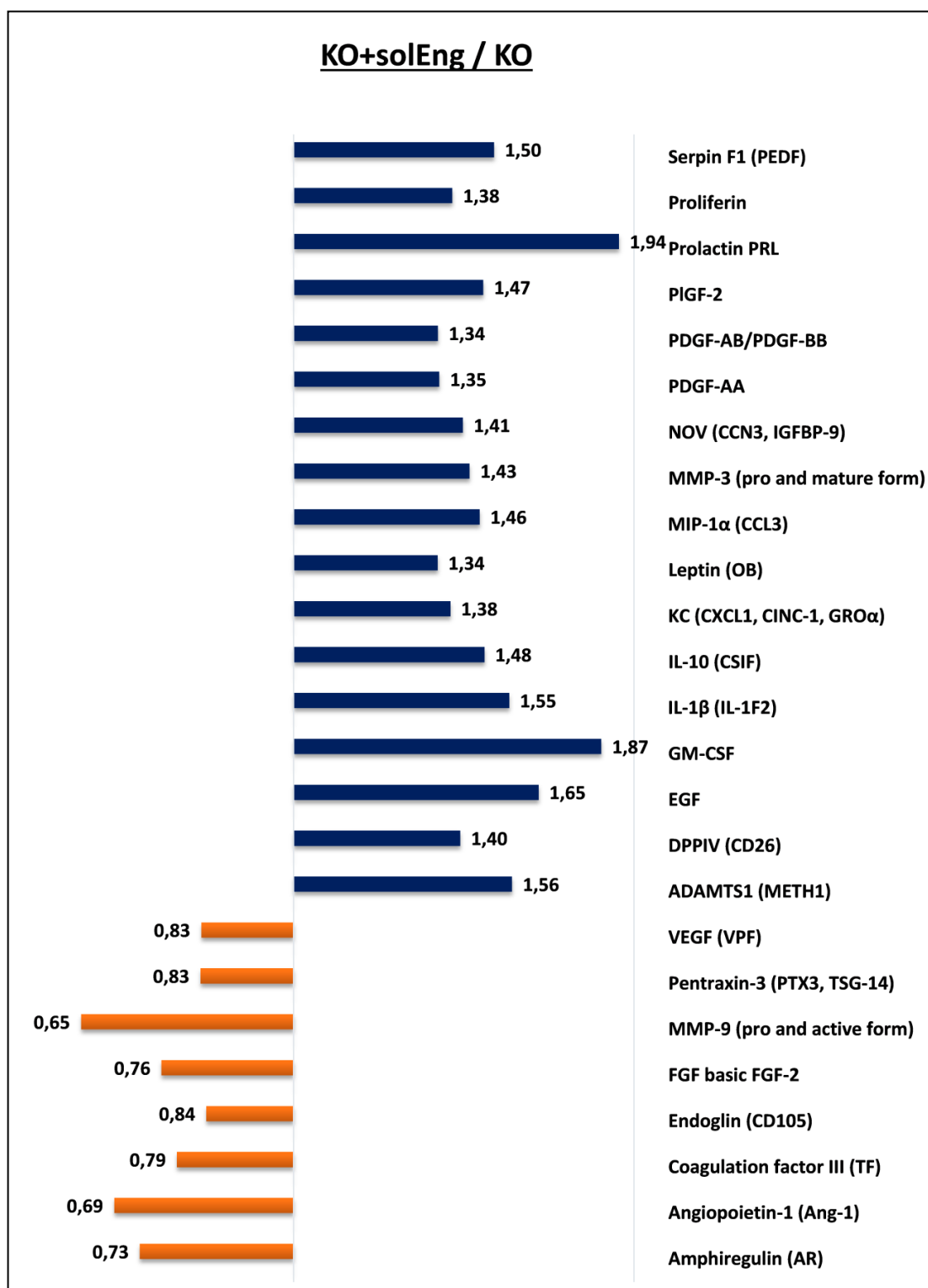
### KO-MLEC2 tratadas con solEng 100ng/mL frente c-MLEC2 sin tratar (Control)



Se muestran los ratios o veces de inducción, en escala logarítmica, normalizadas frente a concentración de proteína, aumentadas (barras azules) o disminuidas (barras naranjas) en KO-MLEC2 tratadas con solEng. A partir de un 25% de inducción (>1,25) o de represión (<0,75) se pueden considerar diferencias significativas.

## ANEXO 6

KO-MLEC2 tratadas con solEng 100ng/mL frente KO-MLEC2 sin tratar

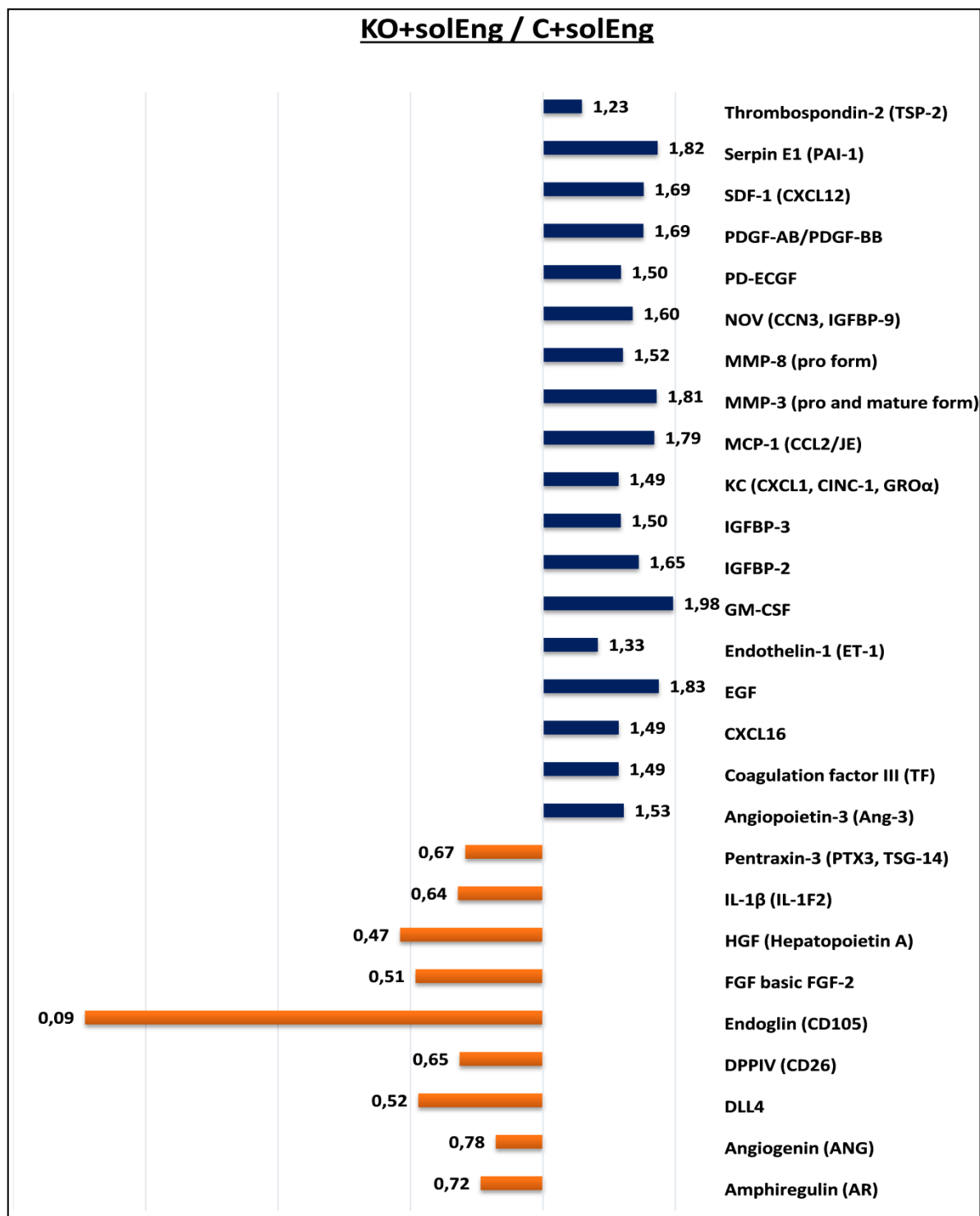


Se muestran las ratios o veces de inducción, en escala logarítmica, normalizadas frente a concentración de proteína, aumentadas (barras azules) o disminuidas (barras naranjas) en KO-MLEC2 tratadas con solEng respecto de KO-MLEC2 sin tratar. A partir de un 25% de inducción (>1,25) o de represión (<0,75) se pueden considerar diferencias significativas.



## ANEXO 7

### KO-MLEC2 tratadas con solEng frente c-MLEC2 tratadas con solEng



Se muestran los ratios o veces de inducción, en escala logarítmica, normalizadas frente a concentración de proteína, aumentadas (barras azules) o disminuidas (barras naranjas) en KO-MLEC2 tratadas con solEng 100 ng/mL respecto C-MLEC2 tratadas también con solEng 100ng/mL. A partir de un 25% de inducción (>1,25) o de represión (<0,75) se pueden considerar diferencias significativas.

## **ANEXO 8**

**Listado completo de proteínas cuantificadas y diferencialmente expresadas tras el análisis mediante iTRAQ, del secretoma del cultivo primario de células humanas endoteliales de cordón umbilical (HUVECs) tratadas con solEng 100ng/mL (24h) respecto HUVECs sin tratar.**

**Se divide en 2 tablas suplementarias:**

**Tabla 1: Proteínas aumentadas.**

**Tabla 2: Proteínas disminuidas.**

## ANEXO 8

**Tabla 1: Proteínas aumentadas (Ratio solEng/Control  $\geq 5\%$ )**

Proteína	Gen	Código de acceso	Ratio medio solEng/Control	%secuencia proteica cubierta	Secuencias peptídicas únicas	Péptidos identificados de la proteína
Serum albumin	ALB	P02768	5,78	3,61	3	434
Endoglin	ENG	P17813	2,62	10,18	5	9
Lysyl-tRNA synthetase	KARS	Q15046	2,31	8,54	4	4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3	O43242	1,55	3,93	2	2
Matrix Gla protein	MGP	P08493	1,40	21,36	2	7
40S ribosomal protein S21	RPS21	P63220	1,39	28,92	2	7
Biotinidase	BTD	P43251	1,27	2,39	1	2
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	UCHL3	P15374	1,27	8,70	1	2
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	P51149	1,25	14,49	3	4
Bone morphogenetic protein 4	BMP4	P12644	1,24	5,15	1	1
Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	RARS	P54136	1,24	3,33	2	3
Serine/threonine-protein phosphatase 5	PPP5C	P53041	1,23	2,20	1	1
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8	Q6P2Q9	1,23	3,38	5	8
PC4 and SFRS1-interacting protein	PSIP1	O75475	1,19	2,83	2	3
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	UBE2K	P61086	1,19	16,50	2	6
Protein FAM10A4	ST13P4	Q8IZP2	1,18	5,42	1	2
Ribonuclease inhibitor	RNH1	P13489	1,18	6,51	2	4
High mobility group protein HMGI-C	HMGA2	P52926	1,18	17,43	1	2
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP	P50552	1,17	15,26	5	12
Histone H2A.Z	H2AFZ	P0C0S5	1,17	17,97	1	8
Lupus La protein	SSB	P05455	1,17	13,73	5	17
Coatamer subunit zeta-1	COPZ1	P61923	1,16	11,86	2	2
Legumain	LGMN	Q99538	1,15	4,39	1	4
Protein CDV3 homolog	CDV3	Q9UKY7	1,15	22,09	2	3
Nidogen-1	NID1	P14543	1,14	2,17	2	4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I	Q13347	1,14	12,00	3	6
Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	P11940	1,13	10,69	5	14
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	O43143	1,13	5,03	3	7
60S ribosomal protein L18	RPL18	Q07020	1,13	27,13	4	19
Clusterin	CLU	P10909	1,13	23,39	8	60
40S ribosomal protein S2	RPS2	P15880	1,13	26,62	6	23
Cytoplasmic aconitate hydratase	ACO1	P21399	1,13	9,11	5	11
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1	Q99536	1,12	18,58	4	8
Hematological and neurological expressed 1 protein	HN1	Q9UK76	1,12	15,58	1	6
Protocadherin-10	PCDH10	Q9P2E7	1,12	1,25	1	2

Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	PPP1R1 4B	Q96C90	1,12	8,84	1	1
Elongation factor 1-beta	EEF1B2	P24534	1,12	12,44	2	5
Fibrillin-1	FBN1	P35555	1,12	1,18	2	8
Bleomycin hydrolase	BLMH	Q13867	1,12	6,37	2	4
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP 200	O75643	1,12	1,12	2	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRNP F	P52597	1,12	14,46	2	21
Protein-L-isoaspartate(D-aspartate)	PCMT1	P22061	1,12	12,78	2	3
Serine protease 23	PRSS23	O95084	1,11	2,87	1	1
40S ribosomal protein S15	RPS15	P62841	1,11	26,90	2	5
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	Q7KZF4	1,11	14,29	10	24
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	P45974	1,10	4,90	3	7
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	ANP32 B	Q92688	1,10	13,94	1	29
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	PRKAC A	P17612	1,10	3,42	1	3
ELAV-like protein 1	ELAVL1	Q15717	1,10	8,28	2	9
HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain	HLA-A	P01892	1,10	13,42	3	15
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	CHD4	Q14839	1,10	0,63	1	2
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	PFAS	O15067	1,10	2,17	2	5
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	P14174	1,10	9,57	1	2
Major vault protein	MVP	Q14764	1,10	10,53	6	14
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT2 1	O43809	1,09	18,06	2	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRNP H3	P31942	1,09	4,91	1	3
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	KHDRB S1	Q07666	1,09	6,55	2	5
Tubulin-folding cofactor B	TBCB	Q99426	1,09	10,66	3	3
Histone H2A type 1-H	HIST1H 2AH	Q96KK5	1,09	27,34	1	353
Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	Q14195	1,09	6,32	3	7
Lysyl oxidase homolog 2	LOXL2	Q9Y4K0	1,09	10,34	6	23
Transforming protein RhoA	RHOA	P61586	1,09	5,18	1	5
ADM	ADM	P35318	1,09	5,95	1	2
Multimerin-1	MMRN 1	Q13201	1,09	28,26	25	201
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UBE2V 2	Q15819	1,09	11,72	2	5
Calpain small subunit 1	CAPNS 1	P04632	1,08	25,00	4	17
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6PR	P20645	1,08	10,11	2	3
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	GALNT 2	Q10471	1,08	6,48	3	6
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1	Q02809	1,08	12,10	7	11
72 kDa type IV collagenase	MMP2	P08253	1,08	21,06	10	51

Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	Q13263	1,08	6,59	3	10
Actin-related protein 2	ACTR2	P61160	1,08	13,96	4	22
Extracellular sulfatase Sulf-1	SULF1	Q8IWU6	1,08	4,59	4	10
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	P63244	1,08	11,99	3	5
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1	P63000	1,08	7,81	2	3
DNA topoisomerase 1	TOP1	P11387	1,08	2,09	1	1
Endothelial protein C receptor	PROCR	Q9UNN8	1,08	11,34	2	9
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3	LTBP3	Q9NS15	1,08	1,30	1	4
Valyl-tRNA synthetase	VAR5	P26640	1,08	4,27	3	6
Biglycan	BGN	P21810	1,08	25,82	7	131
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	HIBADH	P31937	1,07	4,17	1	2
Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	P55209	1,07	12,79	3	13
Spermine synthase	SMS	P52788	1,07	4,92	2	3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A	P62942	1,07	54,63	3	15
Follistatin-related protein 1	FSTL1	Q12841	1,07	11,69	4	12
Protein DJ-1	PARK7	Q99497	1,07	22,22	3	6
Calsyntenin-1	CLSTN1	O94985	1,07	6,32	5	7
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5	O15511	1,07	12,58	1	4
Dynactin subunit 2	DCTN2	Q13561	1,07	12,47	5	8
Protein FAM49B	FAM49B	Q9NUQ9	1,07	5,86	1	4
Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	P49411	1,07	15,49	6	12
Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	P04264	1,07	5,43	3	5
Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	P07384	1,07	3,22	2	2
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	Q13283	1,07	17,17	5	13
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8A	TIMM8A	O60220	1,07	11,34	1	1
Adenosylhomocysteinase	AHCY	P23526	1,07	12,96	5	9
Interstitial collagenase	MMP1	P03956	1,07	5,76	2	5
High mobility group protein B2	HMGB2	P26583	1,07	12,92	3	13
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	P30153	1,07	15,96	7	31
Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	Q99798	1,07	5,13	3	7
Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	HDGFRP2	Q724V5	1,06	5,81	3	5
Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	P20908	1,06	0,98	2	2
Dihydropyrimidinase-related protein 5	DPYSL5	Q9BPU6	1,06	1,24	1	4
Myosin phosphatase Rho-interacting protein	MPRIIP	Q6WCQ1	1,06	1,46	1	2
Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	EEF1E1	O43324	1,06	14,37	1	2
Tight junction protein Z	TJP2	Q9UDY2	1,06	2,44	2	4
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	O14773	1,06	9,77	3	5

ATP-binding cassette sub-family E member 1	ABCE1	P61221	1,06	1,84	1	1
Peroxiredoxin-6	PRDX6	P30041	1,06	26,34	4	14
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	Q99715	1,06	7,64	19	34
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	HSD17B12	Q53GQ0	1,06	12,82	2	8
Exportin-1	XPO1	O14980	1,06	7,19	7	21
Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	P06730	1,06	13,36	2	6
DnaJ homolog subfamily B member 11	DNAJB11	Q9UBS4	1,06	7,54	3	4
Cadherin-2	CDH2	P19022	1,06	1,43	2	5
60S ribosomal protein L30	RPL30	P62888	1,06	7,83	1	6
Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2	P33240	1,06	3,64	1	4
Alpha-centractin	ACTR1A	P61163	1,06	12,23	3	10
Bone morphogenetic protein 6	BMP6	P22004	1,06	2,73	1	9
Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	Q96AE4	1,06	5,43	3	9
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	PSMD12	O00232	1,06	7,46	2	5
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	P27695	1,06	15,09	4	13
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNP L	P14866	1,06	10,70	5	16
Apoptosis inhibitor 5	API5	Q9BZZ5	1,06	3,53	1	2
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3	P26022	1,06	30,97	9	19
Core histone macro-H2A.1	H2AFY	O75367	1,05	5,38	1	4
Dual specificity protein phosphatase 3	DUSP3	P51452	1,05	6,49	1	1
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	O00299	1,05	27,80	6	13
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	P24752	1,05	3,98	1	4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	Q99613	1,05	6,90	4	11
Hedgehog-interacting protein	HHIP	Q96QV1	1,05	12,71	8	25
Myotrophin	MTPN	P58546	1,05	22,03	2	3
Protein phosphatase 1F	PPM1F	P49593	1,05	19,60	4	13
Nucleolin	NCL	P19338	1,05	9,44	7	12
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2	P04899	1,05	12,11	3	8
	OLA1	Q9NTK5	1,05	3,79	1	9
CD109 antigen	CD109	Q6YHK3	1,05	8,93	8	21
Thrombospondin-1	THBS1	P07996	1,05	27,35	30	1627
CD63 antigen	CD63	P08962	1,05	7,56	2	2
Prolyl endopeptidase	PREP	P48147	1,05	4,23	3	4
26S protease regulatory subunit 8	PSMC5	P62195	1,05	10,10	2	16
Phospholipid transfer protein	PLTP	P55058	1,05	7,30	3	5
A-kinase anchor protein 12	AKAP12	Q02952	1,05	5,89	8	17
Cadherin-5	CDH5	P33151	1,05	14,54	9	44
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	XRCC5	P13010	1,05	25,14	11	28

<b>Sulfhydryl oxidase 1</b>	QSOX1	O00391	1,05	21,15	11	45
<b>Calpain-2 catalytic subunit</b>	CAPN2	P17655	1,05	8,29	4	13
<b>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</b>	CPSF6	Q16630	1,05	4,54	1	5
<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</b>	EIF3B	P55884	1,05	7,99	5	13
<b>Proteasome subunit alpha type-1</b>	PSMA1	P25786	1,05	19,39	6	16
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0</b>	HNRNP A0	Q13151	1,05	6,56	1	4
<b>Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein</b>	HSPG2	P98160	1,05	24,46	67	1085
<b>Amyloid beta A4 protein</b>	APP	P05067	1,05	14,29	9	57
<b>Rab GDP dissociation inhibitor beta</b>	GDI2	P50395	1,05	28,76	9	40

**Tabla 1. Proteínas encontradas en el secretoma de HUVECs tratadas con solEng, con expresión aumentada.** Se muestran las proteínas cuya expresión está aumentada en HUVECs tras el tratamiento con solEng, respecto al control. En las distintas columnas se representan el nombre de la proteína, su correspondiente gen, la media de las veces de inducción de la expresión de la proteína en los secretomas de HUVECs tras el tratamiento con solEng comparado con el control, el porcentaje de la secuencia proteica cubierta por los péptidos identificados, el número de secuencias peptídicas únicas para un grupo de proteínas y el número total de péptidos identificados que corresponden a esa proteína. Aquellas proteínas marcadas en rojo, se consideran estadísticamente significativas con p-valor <0,05.

Tabla 2: Proteínas disminuidas (Ratio solEng/Control  $\leq$  5%)

Proteína	Gen	Código de acceso	Ratio medio solEng/Control	%secuencia proteica cubierta	Secuencias peptídicas únicas	Péptidos identificados de la proteína
Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1B L	A6NIZ1	0,95	11,96	2	3
Rho GTPase-activating protein 18	ARHG AP18	Q8N392	0,95	1,66	1	2
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	P31948	0,95	10,68	6	15
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	Q15366	0,95	24,11	4	13
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X	O00571	0,95	8,46	4	12
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SRSF3	P84103	0,95	9,76	2	3
Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	WARS	P23381	0,95	16,35	5	16
Thymosin beta-4-like protein 3		A8MW06	0,95	15,91	1	6
Cathepsin Z	CTSZ	Q9UBR2	0,95	7,26	2	4
T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	P50991	0,95	12,62	4	22
Annexin A5	ANXA5	P08758	0,95	55,63	13	55
Copine-3	CPNE3	O75131	0,95	2,98	1	2
Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	P28070	0,95	9,47	2	3
Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1	Q8IYB3	0,95	2,77	1	1
Epididymal secretory protein E1	NPC2	P61916	0,95	4,64	1	1
Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein		A6NL28	0,95	17,04	2	26
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	P67936	0,95	37,10	8	43
ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H	O75947	0,95	14,29	2	3
14-3-3 protein beta/alpha	YWHA B	P31946	0,95	48,37	5	149
40S ribosomal protein S25	RPS25	P62851	0,95	20,80	3	7
60S ribosomal protein L12	RPL12	P30050	0,95	24,24	3	4
60S ribosomal protein L4	RPL4	P36578	0,95	23,42	8	37
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	P05388	0,95	19,56	5	29
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM 1	P18669	0,95	40,16	7	23
NADH-cytochrome b5 reductase 3	CYB5R 3	P00387	0,95	25,58	5	13
Cystatin-B	CSTB	P04080	0,95	33,67	2	4
4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A 2	P08195	0,95	1,90	1	1
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	P38646	0,95	15,76	10	28
Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC 5	Q8NBS9	0,95	33,56	12	154
Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	P08729	0,95	25,59	11	31
60S ribosomal protein L13	RPL13	P26373	0,95	18,96	4	11
Vimentin	VIM	P08670	0,95	56,01	26	495
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHG DIA	P52565	0,95	24,02	6	19
Stathmin	STMN 1	P16949	0,95	34,90	5	25
Calnexin	CANX	P27824	0,95	28,89	15	52
40S ribosomal protein S23	RPS23	P62266	0,95	15,38	2	10



E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	Q7Z6Z7	0,95	0,32	1	1
60S ribosomal protein L24	RPL24	P83731	0,94	18,47	3	8
Quinone oxidoreductase	CRYZ	Q08257	0,94	16,41	3	12
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	P52272	0,94	15,21	7	16
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	P40926	0,94	23,67	6	31
ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	P05141	0,94	18,79	5	19
Latexin	LXN	Q9BS40	0,94	13,51	2	11
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	P11413	0,94	12,43	6	9
60S ribosomal protein L14	RPL14	P50914	0,94	17,67	4	10
40S ribosomal protein S12	RPS12	P25398	0,94	13,64	2	20
Prohibitin-2	PHB2	Q99623	0,94	19,40	4	9
60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2	P05387	0,94	66,96	4	51
Importin-5	IPO5	O00410	0,94	8,48	7	10
CTP synthase 1	CTPS1	P17812	0,94	4,06	2	6
Endothelial differentiation-related factor 1	EDF1	O60869	0,94	22,97	3	9
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6	P26196	0,94	4,97	1	4
Histone H2B type 1-K	HIST1H2BK	O60814	0,94	47,62	2	267
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHMT2	P34897	0,94	11,51	3	7
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	P11279	0,94	4,80	2	3
RuvB-like 1	RUVBL1	Q9Y265	0,94	5,70	2	5
Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	Q00325	0,94	7,18	2	8
60S ribosomal protein L7a	RPL7A	P62424	0,94	15,79	4	7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	P61978	0,94	23,97	9	65
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	P23284	0,94	29,17	6	23
Alpha-enolase	ENO1	P06733	0,94	44,70	18	164
Ras-related protein Rab-11A	RAB11A	P62491	0,93	7,41	2	7
Reticulocalbin-1	RCN1	Q15293	0,93	25,98	6	12
ATP synthase subunit	ATP5O	P48047	0,93	11,27	2	8
60S ribosomal protein L27	RPL27	P61353	0,93	14,71	2	8
T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	P48643	0,93	14,42	7	16
Acyl-protein thioesterase 1	LYPLA1	O75608	0,93	4,78	1	6
Uncharacterized protein C10orf58	FAM213A	Q9BRX8	0,93	24,45	5	19
PDZ and LIM domain protein 5	PDLIM5	Q96HC4	0,93	4,53	2	6
Triosephosphate isomerase	TPI1	P60174	0,93	44,98	8	53
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA	Q9P0L0	0,93	6,83	2	9
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	P63241	0,93	27,92	3	21
Cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4	Q07065	0,93	29,57	13	34
Heterogeneous nuclear	HNRN	P51991	0,93	20,37	5	9

ribonucleoprotein A3	PA3					
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	SAMM50	Q9Y512	0,93	2,13	1	1
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3	O15145	0,92	11,24	2	5
40S ribosomal protein S8	RPS8	P62241	0,92	21,15	4	15
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4	Q02790	0,92	7,84	3	7
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC2	P22695	0,92	9,49	3	11
Histone H1x	H1FX	Q92522	0,92	7,04	1	4
Protein flightless-1 homolog	FLII	Q13045	0,92	1,10	1	4
Enhancer of rudimentary homolog	ERH	P84090	0,92	5,77	1	2
Histone H4	HIST1H4A	P62805	0,92	57,28	9	224
Endoplasmic	HSP90B1	P14625	0,92	30,39	20	105
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	P61604	0,92	21,57	2	3
Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	P60900	0,92	25,20	5	11
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	LSM6	P62312	0,92	13,75	1	1
Histone H1.3	HIST1H1D	P16402	0,92	18,55	3	20
Histone H3.1	HIST1H3A	P68431	0,92	14,71	3	8
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	P01033	0,92	5,80	1	1
40S ribosomal protein S10	RPS10	P46783	0,91	32,12	5	12
Hemoglobin subunit alpha	HBA1;	P69905	0,91	28,17	3	8
Protein DEK	DEK	P35659	0,91	3,47	1	2
High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	HMGA1	P17096	0,91	23,36	3	64
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	SEC61A1	P61619	0,91	1,89	1	4
Calumenin	CALU	O43852	0,91	24,44	6	16
60S ribosomal protein L23a	RPL23A	P62750	0,91	26,92	4	6
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	RBMX	P38159	0,91	6,65	2	6
60S ribosomal protein L35	RPL35	P42766	0,91	8,13	1	1
Dynactin subunit 1	DCTN1	Q14203	0,91	3,83	3	5
Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	P09972	0,90	6,32	1	4
40S ribosomal protein S13	RPS13	P62277	0,90	21,19	3	10
Calmodulin	CALM1	P62158	0,89	16,11	3	7
F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	P52907	0,89	16,08	3	4
RNA-binding protein 14	RBM14	Q96PK6	0,89	6,13	3	7
40S ribosomal protein S18	RPS18	P62269	0,89	21,05	3	5
Multiple coagulation factor deficiency protein 2	MCFD2	Q8NI22	0,89	16,44	1	2
Proteasome subunit beta type-2	PSMB2	P49721	0,89	14,43	3	6
60S ribosomal protein L34	RPL34	P49207	0,88	5,98	1	2
PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	Q8WW12	0,88	15,17	2	5
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	P21796	0,87	19,43	4	8

Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	TMED2	Q15363	0,87	24,38	4	22
Transmembrane 4 L6 family member 1	TM4SF1	P30408	0,87	4,46	1	3
ATP synthase subunit g, mitochondrial	ATP5L	O75964	0,86	10,68	1	2
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	AKR7A2	O43488	0,86	9,47	2	4
Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	P13645	0,86	7,71	3	5
60S ribosomal protein L29	RPL29	P47914	0,85	9,43	1	7
Ras-related protein Rab-1A	RAB1A	P62820	0,85	13,66	1	6
ATP synthase subunit b, mitochondrial	ATP5F1	P24539	0,84	10,94	3	12
Cytochrome c	CYCS	P99999	0,83	30,48	3	14
Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	P28066	0,80	17,84	4	14
Non-histone chromosomal protein HMG-14	HMG1	P05114	0,78	23,00	2	5

**Tabla 2. Proteínas encontradas en el secretoma de HUVECs tratadas con solEng, con expresión disminuida.** Se muestran las proteínas cuya expresión está disminuida en HUVECs tras el tratamiento con solEng, respecto al control. En las distintas columnas se representan el nombre de la proteína, su correspondiente gen, la media de las veces de inducción de la expresión de la proteína en los secretomas de HUVECs tras el tratamiento con solEng comparado con el control, el porcentaje de la secuencia proteica cubierta por los péptidos identificados, el número de secuencias peptídicas únicas para un grupo de proteínas y el número total de péptidos identificados que corresponden a esa proteína. Aquellas proteínas marcadas en verde, se consideran estadísticamente significativas con p-valor <0,05.

**ANEXO 9 (Artículo surgido de la primera parte del  
trabajo mostrado en esta tesis doctoral)**

**“Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloproteinase MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury”.**

# Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury

Eunate Gallardo-Vara<sup>1,2</sup> · Francisco J. Blanco<sup>1,2</sup> · Mercè Roqué<sup>3</sup> · Scott L. Friedman<sup>4</sup> · Toru Suzuki<sup>5,6</sup> · Luisa M. Botella<sup>1,2</sup> · Carmelo Bernabeu<sup>1,2</sup>

Received: 30 August 2015 / Accepted: 23 January 2016 / Published online: 5 February 2016  
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** After endothelial injury, the transcription factor Krüppel-like factor 6 (KLF6) translocates into the cell nucleus to regulate a variety of target genes involved in angiogenesis, vascular repair and remodeling, including components of the membrane transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) receptor complex such as endoglin and activin receptor-like kinase 1. The membrane metalloprotease 14 (MMP14 or MT1-MMP) targets endoglin to release soluble endoglin and is involved in vascular inflammation and endothelial tubulogenesis. However, little is known about the regulation of MMP14 expression during vascular wounding. In vitro denudation of monolayers of human endothelial cell monolayers leads to an

increase in the KLF6 gene transcriptional rate, followed by an upregulation of MMP14 and release of soluble endoglin. Concomitant with this process, MMP14 co-localizes with endoglin in the sprouting endothelial cells surrounding the wound border. MMP14 expression at mRNA and protein levels is increased by ectopic KLF6 and downregulated by KLF6 suppression in cultured endothelial cells. Moreover, after wire-induced endothelial denudation, *Klf6*<sup>+/-</sup> mice show lower levels of MMP14 in their vasculature compared with their wild-type siblings. Ectopic cellular expression of KLF6 results in an increased transcription rate of MMP14, and chromatin immunoprecipitation assays show that KLF6 interacts with MMP14 promoter in ECs, this interaction being enhanced during wound healing. Furthermore, KLF6 markedly increases the transcriptional activity of different reporter constructs of MMP14 gene promoter. These results suggest that KLF6 regulates MMP14 transcription and is a critical player of the gene expression network triggered during endothelial repair.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10456-016-9495-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carmelo Bernabeu  
bernabeu.c@cib.csic.es

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, c/Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid 28040, Spain

<sup>3</sup> Servei de Cardiologia, Hospital Clínic i Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Division of Liver Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

<sup>5</sup> Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, Leicester, UK

<sup>6</sup> National Institute for Health Research, Leicester Cardiovascular Biomedical Research Unit, Glenfield Hospital, Leicester, UK

**Keywords** Endothelial cells · Vascular injury · Transcription · KLF6 · MMP14 · Soluble endoglin

## Introduction

The endothelium plays a crucial role in regulating pathophysiological processes like vascular injury, angiogenesis, vascular remodeling, tumor growth, vasoconstriction, vasodilatation, inflammation or blood vessel permeability. During all these processes, proliferation, migration and invasion of endothelial cells (ECs) are essential and the study of the regulatory mechanisms involved in endothelial gene expression is a necessary step in the search of therapeutic targets.

Upon vascular injury, a coordinated gene expression program is triggered among those genes coding for extracellular matrix proteins, growth factors, receptors and proteases. One of these classes of proteins is the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family, which includes TGF- $\beta$ , activins and bone morphogenetic proteins (BMPs). TGF- $\beta$ s are angiogenic factors that target ECs during vascular wound healing and signal through the Smad family of transcription factors [1]. Mutations in endothelial components of the TGF- $\beta$  system are responsible for several inherited vascular diseases [2]. Thus, heterozygous for mutations in the *ENG* (endoglin), *ACVRL1* (activin receptor-like kinase 1; ALK1), *GDF2* (BMP9) or *SMAD4* genes results in different variants of the familial vascular disorder known as hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) characterized by an abnormal angiogenesis process where boundaries between arteries and veins are not well established [3, 4]. Endoglin protein is a membrane TGF- $\beta$  co-receptor expressed primarily in ECs to regulate TGF- $\beta$  signaling in the cardiovascular system [5, 6]. Endoglin is essential for angiogenesis during development, required for the maintenance of a normal vasculature in the adult, and mice that are homozygous for mutations in *Eng* die in mid-gestation from vascular defects [7–9].

The matrix metalloproteases (MMPs) represent an important family of proteins involved in diverse biological processes, including angiogenesis, stroke, vascular repair, inflammation and cancer [10–13]. Sustained MMP activity is associated with vascular pathologies such as hypertension, restenosis, vascular malformations and atherosclerosis [14, 15]. During angiogenesis, MMPs play a key role in extracellular matrix degradation, favouring endothelial cell migration and vascular invasion. Among these, MMP14 is a membrane-type MMP (MT-MMP) belonging to the collagenase type I class. In the vascular setting, MMP14 is involved in: (i) capillary tube formation of human ECs using 3D collagen matrices [10, 16]; (ii) the inflammatory response of ECs [17]; (iii) the atherosclerotic plaque vulnerability [18–20]; and (iv) the cross-talk between human airway basal cells and ECs [21]. Interestingly, MMP14 is upregulated in wound-derived blood vessels compared with vessels from intact human skin [22]. In addition to degrading the collagen surrounding new vascular cells [23], MMP14 releases latent TGF- $\beta$ 1 from latent TGF-binding protein (LTBP) and activates other MMPs secreted to the medium, such as MMP2, which has a critical role downstream of MMP14 for angiogenesis-mediated tumor invasion [24]. An increased number of MMP14 proteolytic substrates have been described recently, as well as its adhesive role in binding to collagens, glycoproteins, proteoglycans, integrins, cadherins and CD44 [17, 24]. In ECs, membrane endoglin is a proteolytic substrate of MMP14 resulting in the release of soluble endoglin [25, 26], which

is associated with systemic hypertension during pregnancy and contributes to the pathogenesis of preeclampsia [26–29]. Soluble endoglin antagonizes the functions of its membrane-bound form by inhibiting angiogenesis, capillary tube formation and sprouting, and increasing vascular permeability [25, 27, 30]. However, little is known about the putative release of soluble endoglin during endothelial injury and how MMP14 gene expression is activated to cleave membrane endoglin.

The zinc finger Krüppel-like factor (KLF) family of transcription factors regulates diverse biological processes including proliferation, development, survival and responses to external stress [31, 32]. Several studies support an important role for this family of factors in vascular biology [33]. KLF6 is considered as a damage-response factor that promotes vascular remodeling because of its ability of transactivating several endothelial target genes by direct binding to their promoters [31]. Upon vascular injury, KLF6 expression increases and translocates into the nucleus to specifically enhance the transcriptional activity of endoglin and activin receptor-like kinase 1 (ALK1) [34, 35]; two key TGF- $\beta$  receptors involved in vascular remodeling and angiogenesis [36]. KLF6 also targets a pool of genes involved in motility and invasion during vascular remodeling and angiogenesis including collagen  $\alpha$ 1 [37], E-cadherin, MMP9, tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), urokinase plasminogen activator, IL6 and VEGF [31, 33, 34, 38]. Furthermore, KLF6 knock-out mice are embryonic lethal due to a failure of erythropoiesis and yolk sac vascularization [39]. Altogether, these data point to KLF6 as a key regulator of angiogenesis and vascular remodeling.

Here, we have addressed whether gene expression of MMP14 and its proteolytic activity on its substrate endoglin are deregulated upon vascular injury. We have also investigated the possible involvement of the transcription factor KLF6 during this process. Our results demonstrate that on vascular injury, KLF6 transcriptionally upregulates the expression of MMP14 that is associated with increased MMP14 proteolytic activity leading to the release of soluble endoglin from ECs.

## Materials and methods

### Cell culture

The primary culture of human umbilical vein-derived endothelial cells (HUVEC) was obtained from Lonza. These cells were cultured in early passages (3–10) and exponentially grown onto 0.2 % gelatin (Sigma) pre-coated plates in endothelial basic medium (EBM2) supplemented with endothelial growth medium (EGM2; Lonza). The

human embryonic kidney (HEK293T) cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco). Both cell types were cultured at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. All the media were supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco).

### Endothelial wound healing assay

For wound healing assays, cells were grown to confluence onto 0.2 % gelatin pre-coated wells. The wound was created by scratching the cell monolayer using a sterile pipette tip. Then, plates were immediately washed twice with PBS to remove the remaining cells and fresh medium was added. Endothelial cell migration into the denuded area was monitored with photographs taken at the time of the wound (0 h) and 2, 4, 6, 8 and 24-h post-wound. The Image J program was used to quantify the wound healing process by measuring the distance between the edges of the denuded area.

### Mice and mechanical injury experiments

Generation of *Klf6*<sup>+/-</sup> mice in the C57BL/6 strain has been previously reported [39]. To monitor the expression pattern of MMP14 in a vascular injury, we followed the technique described by Garrido et al. [34]. Briefly, *Klf6*<sup>+/+</sup> and *Klf6*<sup>+/-</sup> mice were anesthetized and underwent bilateral endoluminal injury to the common femoral artery by passing three times a 0.25-mm-diameter angioplasty guidewire as described [40]. At 28 days post-injury, mice were killed and approximately 2-mm-thick transverse segments were cut at the level of the injury, in previously isolated hind limbs blocks embedded in paraffin. Five-µm cross-sections were obtained throughout the injured fragment.

### Immunohistochemistry

Paraffin embedded sections of femoral arteries were pre-warmed at 60 °C and deparaffinized with xylene prior to hydration with a series of ethanol-graded dilutions followed by distilled water. Slides were subjected to antigen retrieval with 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0 for 45 min at 95 °C in a water bath. The endogenous peroxidase activity of the tissues and unspecific epitopes was blocked with “peroxidase blocking reagent” during 5 min and “protein blocking reagent” during 30 min, respectively. All the reagents used were from NovoLink Polymer Detection System Kit for IHC (Novocastra, Millipore). MMP14 staining was detected with a rabbit monoclonal anti-MMP14 antibody (ab51074, Abcam) incubated overnight at 4 °C. Then, samples were incubated with the

secondary antibody biotin-goat anti-rabbit IgG (H + L), followed by incubation with streptavidin–HRP (Cat #21126; Pierce). For development of the peroxidase activity, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen was used. Nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin 0.02 %, followed by immersion in ammonia water. Finally, slides were mounted in HiMo (05-HM, Bio-Optica, Milano, Italy) for observation with a camera-coupled bright-field microscope.

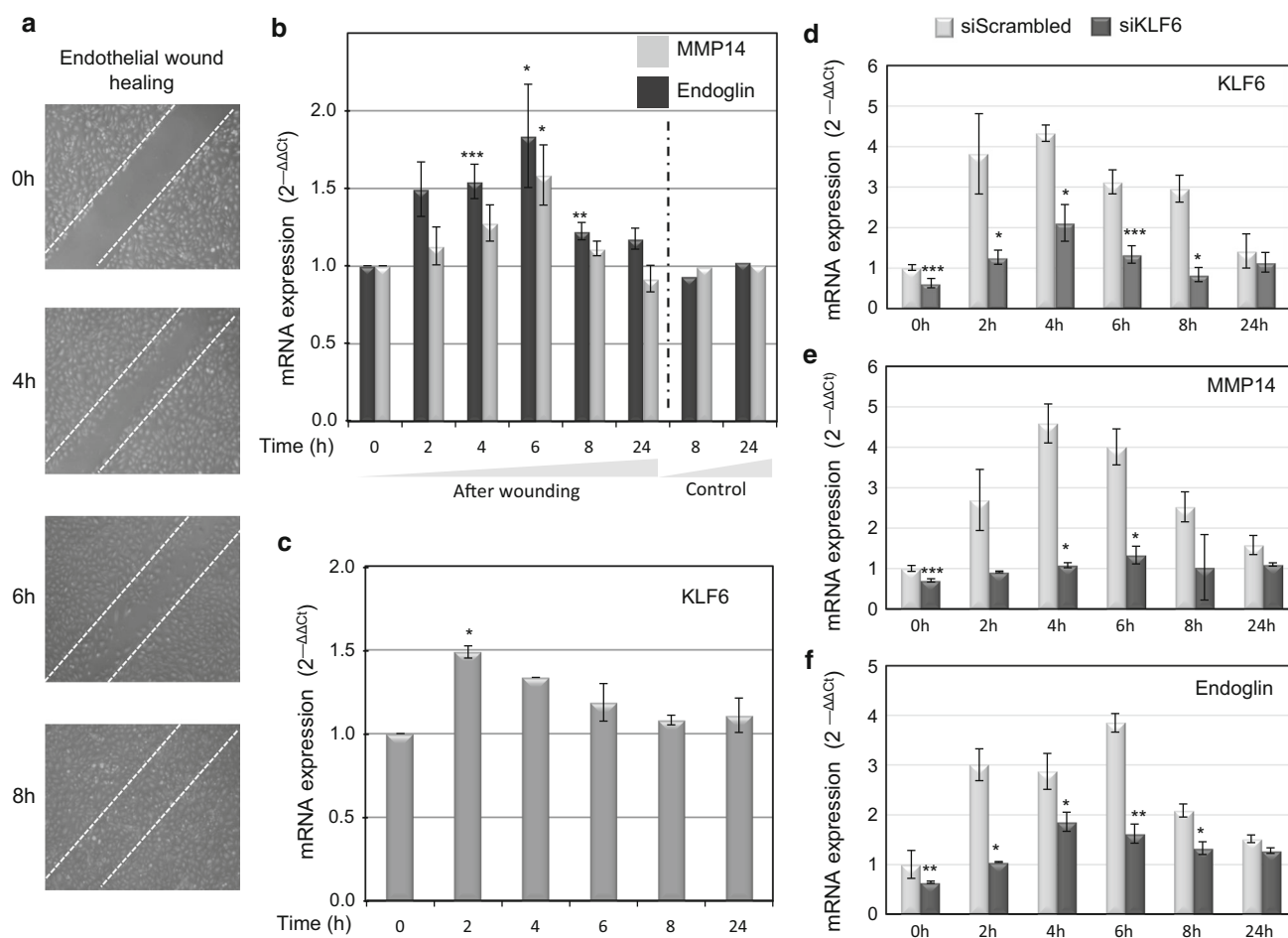
### ELISA of soluble endoglin and IL-6

HUVEC monolayers were scratched with a pipette tip as described above. Culture supernatants were collected at the indicated times and analyzed by ELISA assays. Concentrations of human soluble endoglin and human IL-6 in the cell culture media were determined according to the manufacturer protocol by Quantikine Human Endoglin/CD105 and Quantikine Human IL-6, respectively (DNDG00 and D6050; R&D Systems). Soluble endoglin was also measured in the culture media of HUVECs or HEK293T cells previously transfected with expression vectors, as indicated. All immunoassays were measured in a GloMax multidetection system (Promega) and normalized by the percentage of cells in each control and post-wounded well.

### Immunofluorescence microscopy

In order to monitor the co-localization of MMP14 and endoglin in the membrane during the wound healing process, HUVECs were grown to confluence onto 12-mm-diameter coverslips, previously coated with 0.2 % (v/v) gelatin (Sigma-Aldrich) in PBS. When necessary, HUVECs were nucleofected with KLF6 plasmids and siRNAs for 48 h, prior to the wound healing assay. Then, the endothelial monolayer was disrupted once with a micropipette tip. After 4 and 6 h, cells were fixed with 3 % paraformaldehyde in PBS and blocked with PBS-BSA 1 %, prior to the incubation with the primary antibody mouse antihuman endoglin (P4A4; DHSB). Afterward, samples were washed with PBS twice and incubated with the second primary antibody, monoclonal rabbit antihuman MMP14 (ab51074, Abcam). Then, cells were incubated with two different secondary antibodies: Alexa 488 goat anti-mouse IgG and/or Alexa 647 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Invitrogen). To visualize the samples and for nuclear staining, the slides were mounted in Prolong-DAPI reagent (Molecular Probes, Invitrogen). Samples were observed using a fluorescence confocal microscopy Sp5 (DMI6000 CS Leica Microsystems). For the semi-quantification of fluorescence intensity and co-localization of endoglin and MMP14, an analysis of scatter





**Fig. 1** MMP14 and endoglin mRNA levels increase in endothelial cells after in vitro denudation. **a** HUVECs were wounded in vitro, leaving approximately 40 % intact of total monolayer. Photographs were taken at different times after wounding (0–8 h). Cells were lysed at the times indicated (0–24 h), and RNA was extracted and processed for qRT-PCR of human MMP14 and endoglin genes (**b**). KLF6, as a primary response gene to injury, was also quantified (**c**). mRNA expression levels of KLF6 (**d**), MMP14 (**e**) and endoglin (**f**) genes

were measured upon KLF6 suppression with siRNA specific for KLF6 (siKLF6), using scrambled siRNA as a control. Fold change of mRNA expression levels with respect to basal conditions are indicated. Results were normalized to gene expression levels of 18S rRNA, as a housekeeping gene that does not change during the wound healing process. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  with respect to basal conditions

plots (cytofluorograms) was carried out in the central layers of each condition. Data about the distribution of fluorescence signals and specific overlapping pixels were obtained taking into account Pearson's correlation and setting a common background and threshold for green and red channels. All these measurements were obtained using the Image J and LAS-AF 2.6 software.

### In silico analysis of promoter sequences

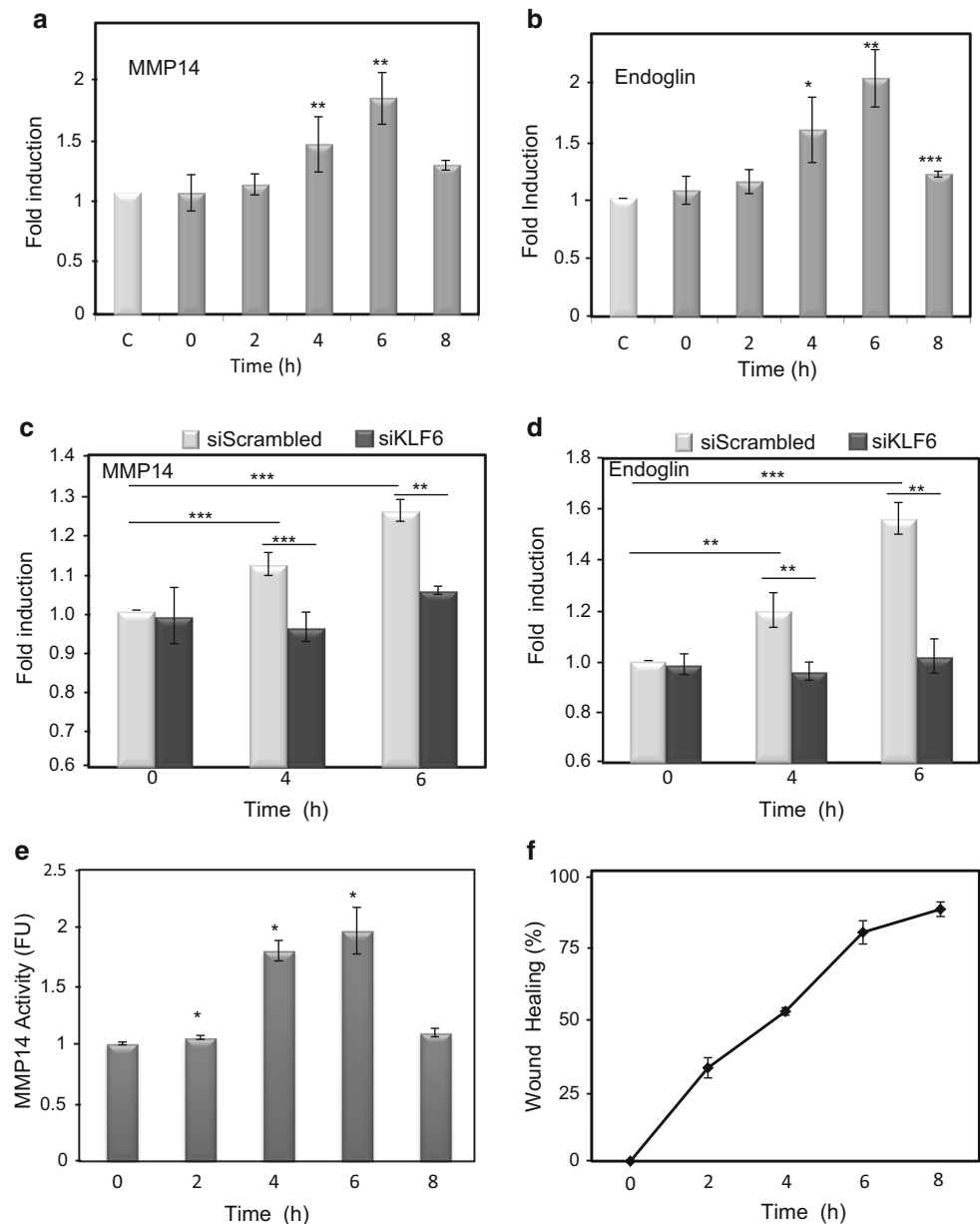
*In silico* analysis of GC-boxes containing putative KLF6 and Sp1 motifs in the MMP14 proximal promoter, corresponding to the upstream sequences of human (ID: 4323) and mouse (ID: 17387) genes, was performed by the Genomatrix MatInspector software tool (<http://www.genomatrix.de/products/MatInspector>).

### Flow cytometry

HUVECs were collected at different times (0, 2, 4, 6 and 8 h) after injury for the analysis of MMP14 and endoglin expression levels at the endothelial cell surface. Cells were incubated with a mouse monoclonal antibody against human endoglin (CD105; P4A4) or a rabbit monoclonal antibody against human MMP14 (ab51074, Abcam). A negative control was included using an irrelevant isotype control antibody X63 (IgG1). After washing the cells, they were incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (A-11001 Molecular Probes, Invitrogen) for endoglin detection or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (11008 Molecular Probes, Invitrogen) for MMP14 detection. When working with nucleofected HUVECs, the expression levels of endoglin and MMP14 were measured by incubation with



**Fig. 2** MMP14 protein expression and activity are increased during wound healing. MMP14 (a) and endoglin (b) protein levels on the surface of HUVECs at different time points during wound healing experiments were analyzed by flow cytometry as described in “Materials and methods.” Histograms indicate protein levels represented as fold induction with respect to resting cells at 8 h (control, C). MMP14 (c) and endoglin (d) protein levels on the surface of HUVECs at different time points after wound healing were measured by flow cytometry upon KLF6 suppression with siRNA specific for KLF6 (siKLF6). Scrambled siRNA (siScrambled) was used as a control. Histograms indicate protein levels represented as fold induction with respect to cells at 0 h. e MMP14 activity was measured during endothelial wound healing using a fluorogenic peptide and represented as a fold induction with respect to cells at time 0 h. f The percentage of endothelial healing is represented at different time points after wounding. Cells at approximately 80 % confluency (6 h after wounding) showed the highest MMP14 activity. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  with respect to control condition (a, b), to time 0 h (e), or as indicated (c, d)



directly conjugated primary antibodies: Alexa Fluor 488 antihuman MMP14 (#128527; R&D Systems) and APC anti-endoglin/CD105 (#166707; R&D Systems). The fluorescence intensity was estimated with an EPICS XL and FC 500 flow cytometers (Beckman Coulter). A minimum of 10,000 cells were counted for each experimental point.

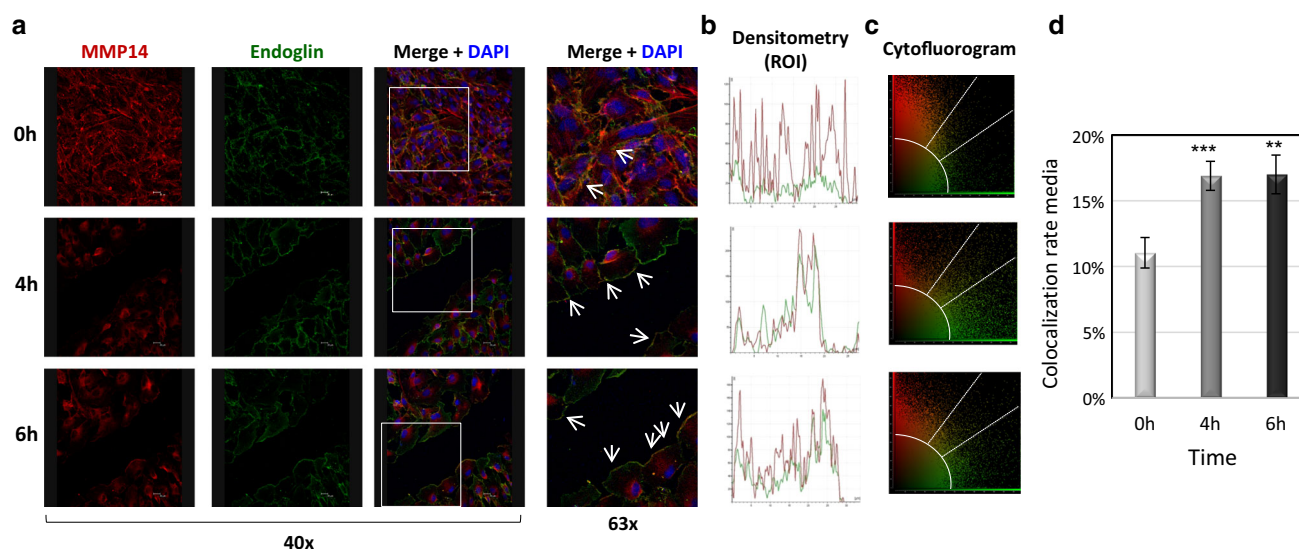
### Metalloproteinase activity

Metalloproteinase activity of HUVECs was determined using the fluorogenic peptide substrate Mca-PLGL-Dpa-AR-NH<sub>2</sub> (ES001; R&D Systems). HUVEC monolayers, at control conditions and at different times after wounding, were washed and incubated with 3  $\mu$ M fluorogenic peptide

diluted in DMSO and TNC buffer (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.002 % NaN<sub>3</sub>; pH, 7.5) during 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding stop solution 10X (100 nM EDTA + 0.02 % NaN<sub>3</sub>). The fluorescence signal was read with a Varioskan flash spectral scanning multimode reader (Thermo Scientific).

### Quantitative real-time PCR

Total mRNA was isolated with the SpeedTools Total RNA Extraction Kit (Biotools). A total of 1  $\mu$ g of RNA was retrotranscribed with a high capacity cDNA reverse transcription kit (170-8891; iScript cDNA Synthesis kit; BioRad). The resulting cDNA was used as a template for



**Fig. 3** MMP14 and endoglin co-localize upon endothelial denudation. HUVEC monolayers were wounded *in vitro*, and the presence of MMP14 and endoglin was detected by immunofluorescence at the indicated time points. Cells were incubated with a mouse antibody anti-endoglin (P4A4) or a rabbit antibody anti-MMP14, followed by a secondary anti-mouse IgG coupled to Alexa 488 (green staining) or a secondary anti-rabbit IgG coupled to Alexa 647 (red staining). **(a)** Single staining and merge images plus DAPI (nuclear staining in blue) are shown at the indicated magnifications (40× and 63×). The arrows indicate sites where MMP14 and endoglin co-localize (yellow color). A magnification (63×) of the merge images (area within the square) is shown in the right column. **(b)** Using merge images (63×), measurements of endoglin (green) and MMP14 (red) along 30-μm

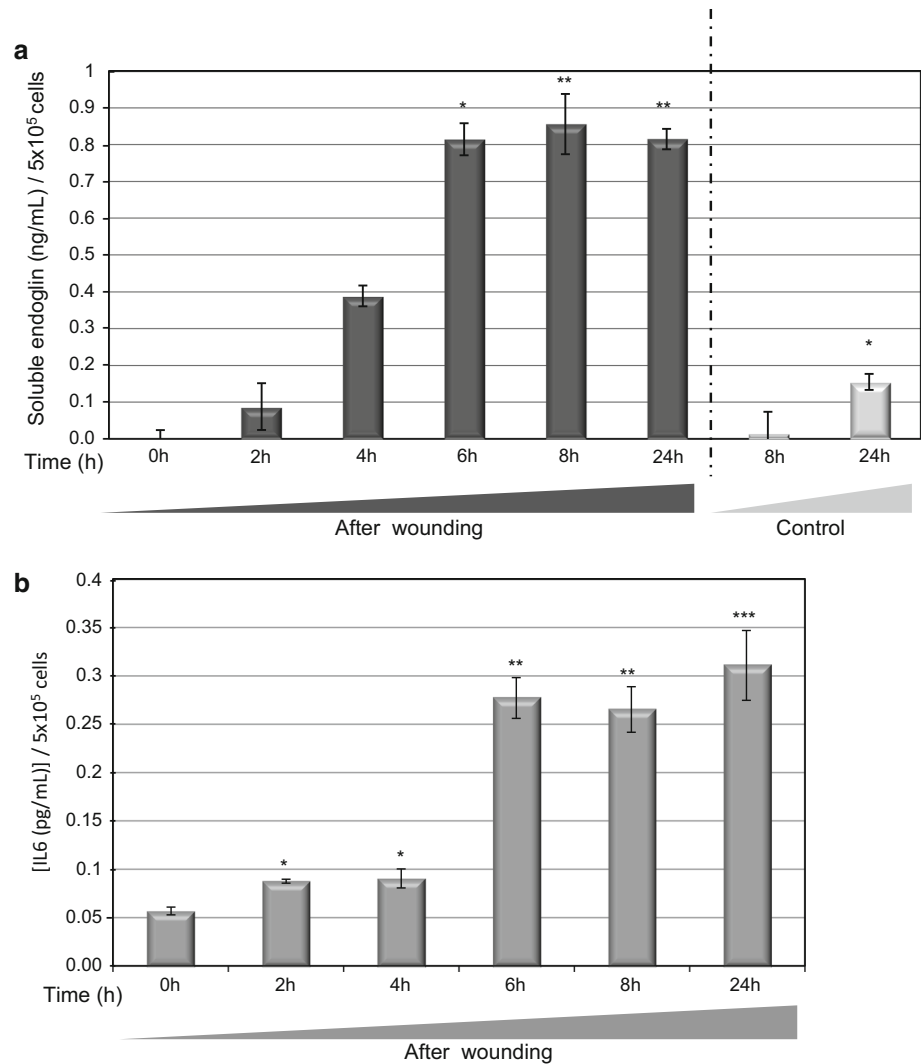
length longitudinal sections of representative membrane areas (indicated by arrows) of each condition were carried out. Fluorescence intensities were measured and represented in histograms using Image J software tool. Densitometry profiles of the region of interest (ROI) and distributions of both signals at distinct time points (0, 4, and 6 h) are shown. **(c)** Representative merge images showing the co-localization of MMP14 and endoglin (area within the two white lines) in cytofluorograms. This scatter plot shows an increased co-localization area/area foreground (or total fluorescence area) upon endothelial wounding. **(d)** Quantification (percentage) of MMP14 and endoglin co-localization obtained from the cytofluorograms. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  with respect to time 0 h. This is a representative experiment of ten different ones

quantitative real-time PCR (qRT-PCR) performed using LightCycler 480 PCR Master SYBR Green (Roche Applied Biosciences). Oligonucleotides for selected genes were designed using Roche software for qRT-PCR. The following forward (Fw) and reverse (Rv) primers were used: hENG, Fw 5'-GCCCCGAGAGGTGCTTCT-3' and Rv 5'-TGCAGGAAGACACTGCTGTTTAC-3'; hKLF6, Fw 5'-CGGACGCACACAGGAGAAAA-3' and Rv 5'-CGGTG TGCTTTCGGAAGTG-3'; hIL6, Fw 5'-GAAGGCAG CAGGCAACAC-3' and Rv 5'-CAGGAGCCCAGCTAT GAAC-3'; hMMP14, Fw 5'-CGATGTGGTGTTCAG ACA-3' and Rv 5'-TGGATGCAGAAAGTGATTTC-3'. As an internal control, mRNA levels of 18S were measured using primers Fw 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' and Rv 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'. Amplicons were detected using a LightCycler 480 System II-384 (Roche Applied Biosciences). The specificity of the PCR products was assessed by melting curve analyses which showed only single amplified products. Assays were done in triplicate, and the results were normalized according to the expression levels of 18S rRNA.

### Cell transfection, plasmids and reporter assays

Transient HEK293T transfections and HUVECs nucleofections were carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and Amaxa HUVEC Nucleofector kit (VPB-1002, Lonza), respectively, according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed 48 h later for protein and mRNA expression by flow cytometry or qRT-PCR. Human KLF6 was overexpressed by the encoding vector pCiNeo/KLF6 [35]. The siRNA-mediated KLF6 knock-down was carried out using a pool of five siRNAs targeting human KLF6 (sc-38021; Santa Cruz Biotechnology) and scrambled siRNA (Universal negative control SIC001; Sigma), as a negative control. The pMax-GFP vector (Amaxa Biosystems) was used as a control to assess transfection efficiency. For MMP14-luciferase reporter assays, three different 5'-serial constructs (−1544/+235; −800/+235; −300/+235) of the MMP14 promoter (pMT1) were chemically synthesized and cloned (BioNova Cientifica SL) into the pGL2-luc basic reporter plasmid (Promega). HEK293T cells were co-transfected with

**Fig. 4** Soluble endoglin is released during wound healing of endothelial cells. HUVEC monolayers were wounded in vitro, culture supernatants were collected at different times, and levels of soluble endoglin (a) and IL6 (b) were measured by ELISA and compared to unwounded cells (control). Concentrations of soluble endoglin and IL6 are referred to  $5 \times 10^6$  cells. Basal levels of unwounded cells were subtracted from IL6 levels of cells after wounding at the same time points. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  with respect to time 0 h condition

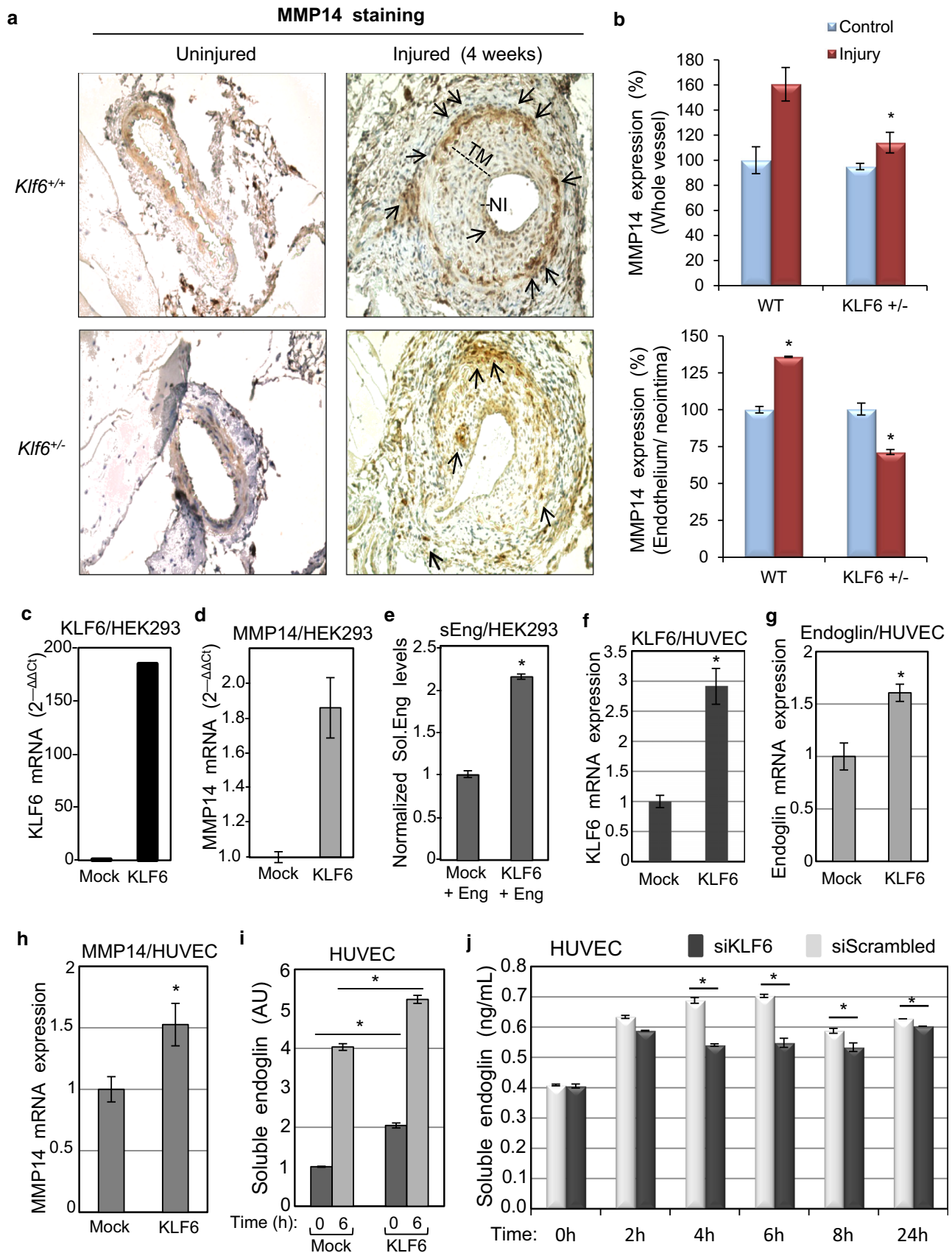


1  $\mu$ g/well of pGL2-luc basic promoter, pGL2-luc-pMT1-1544, pGL2-luc-pMT1-800 or pGL2-luc-pMT1-300 and Mock or pCineo-KLF6 expression vector [34] for each condition. Forty-eight hours after transfection, cell lysates were analyzed using dual-luciferase reporter assay system (Promega) in a GloMax multidetection system luminometer (Promega). Transfection efficiency was normalized to  $\beta$ -galactosidase luciferase activity.

#### Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP)

ChIP experiments were performed with ChIP-IT Express Enzymatic kit (#53009; Active Motif) in HUVECs, as described by Garrido et al. [34]. Briefly, aliquots of the final sheared chromatin were used as “input chromatin” and the rest was incubated with protein G magnetic beads and 10  $\mu$ g of rabbit polyclonal antibody antihuman KLF6 (#R-173; sc-7158, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody anti-histone H3K4me2 (#39141;

Active Motif) or control rabbit IgG (#sc-2027; Santa Cruz Biotechnology). Protein G magnetic beads bound to the immune complexes were pelleted, washed and eluted. Then, cross-linking was reversed and samples were incubated with proteinase K and precipitated prior to resuspension in TE buffer. Binding of KLF6 was analyzed by PCR using primer pairs of four main KLF6-sites rich regions in the MMP14 promoter sequence. The first region encompasses from −1142 to −857 (285-bp), the second one from −783 to −569 (214-bp), the third one from −107 to +72 (179-bp) and the fourth one from −7 to +233 (240 bp). Sequences of primer pairs were: first region, Fwd 5'-AGACTTCTATTCTTCTGCCA-3' and Rev 5'-ATAAA GCTGACCGTGAGA-3'; second region, Fwd 5'-CTTTAA GAATTGCCTCCTTT-3' and Rev 5'-CCAACCTTTGTA GAAAGACA-3'; third region, Fwd 5'-GGCTAAACAA ACCACGTC-3' and Rev 5'-GTGCCTGTTTGCTCTTC T-3'; and fourth region, Fwd 5'-AGGGAACCAACCC AGTTCG-3' and Rev 5'-TCCGAGACCACCGGTCA-3'.





**Fig. 5** KLF6 regulates MMP14 expression. *Klf6*<sup>+/-</sup> heterozygous mice express lower levels of MMP14 after endothelial injury. **a** Immunohistochemical staining of MMP14 in mouse femoral artery after endothelial injury (4 weeks) compared to uninjured samples from *Klf6*<sup>+/-</sup> heterozygous and *Klf6*<sup>+/+</sup>WT mice. Pictures were taken at  $\times 25$  magnification. In WT animals, MMP14 expression is upregulated (*black arrows*) in neointima and tunica media of femoral arteries after endothelial injury and this upregulation was less pronounced in *Klf6* heterozygous mice. **b** Histograms representing the MMP14 media expression samples ( $n = 5$  for each condition) of femoral arteries after endothelial injury comparing WT and *Klf6* heterozygous mice. Measurements of whole vessels (*upper histogram*) and endothelium/neointima (*bottom histogram*) were normalized taking into account the width of vessels or neointima, respectively ( $*p < 0.05$  with respect to control condition). NI, neointima; TM, tunica media. **c–e** Overexpression of KLF6 increases MMP14 mRNA expression and soluble endoglin release in cultured cells. HEK293T cells were transfected with expression vectors encoding KLF6 (pciNeo KLF6) or endoglin (Eng) and an empty vector (Mock), as indicated. Quantification by qRT-PCR of ectopic KLF6 (**c**) and endogenous MMP14 (**d**) transcript levels. Levels of soluble endoglin released to the medium were measured by ELISA (**e**). **f–i** Overexpression of KLF6 increases MMP14 mRNA expression and soluble endoglin release in HUVECs. HUVECs were nucleofected with an expression vector encoding KLF6 (pciNeo KLF6) or an empty vector (Mock), as indicated. Quantification by qRT-PCR of KLF6 (**f**) and endogenous endoglin (**g**) and MMP14 (**h**) transcript levels. Levels of soluble endoglin released to the medium from HUVECs subjected to endothelial denudation for 6 h were measured by ELISA (**i**). **j** KLF6 suppression was carried out in HUVECs by nucleofection with siRNA specific for KLF6 (siKLF6), using Scrambled siRNA (siScrambled) as a control. Nucleofected HUVECs were wounded in vitro and supernatants were collected at different times. Soluble endoglin levels were measured by ELISA, as described in Materials and Methods. In **c–i**, values were normalized to mock or untreated cells at time 0 h.  $*p < 0.05$  as indicated

For negative and positive control PCRs, primers from ChIP-IT control human kit (#53010; Active Motif) were used.

## Statistics

Data were subjected to statistical analysis, and the results are shown as mean  $\pm$  SD. Differences in mean values were analyzed using Student's *t* test. In figures, statistically significant values are marked with asterisks ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.005$ ; *ns* not significant).

## Results

### MMP14 and endoglin protein expression increases during endothelial denudation

We have previously demonstrated that following endothelial injury, KLF6 expression increases and translocates into the nucleus to specifically enhance the transcriptional activity of membrane-bound endoglin [35]. Because

MMP14 can target membrane endoglin to release soluble endoglin [25, 26], we wondered whether MMP-14 expression was also modulated during endothelial wound healing. After denudation injury experiments performed in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Fig. 1a), MMP14 and endoglin expression was upregulated at mRNA (Fig. 1b) and cell surface protein (Fig. 2a, b) levels during the central hours (4–6 h) of the healing process. As expected, KLF6, a primary response gene to injury, was upregulated at early stages (2 h; Fig. 1c) of the wound healing process, an interval that is compatible with its transcriptional involvement in the subsequent increased expression of endoglin [35]. Interestingly, suppression of KLF6 in HUVECs (Fig. 1d) markedly inhibited the injury-induced expression of MMP14 and endoglin at mRNA (Fig. 1e, f) and protein (Fig. 2c, d) levels. The upregulation of MMP14 suggests an active role for its catalytic activity during the wound healing process. Indeed, using a fluorogenic peptide as a substrate, the proteolytic activity of MMP14 was steadily increased during the endothelial repair process (Fig. 2e, f). Among others, the proteolytic activity of MMP14 may contribute to degrade extracellular matrix proteins, as a typical collagenase that, in turn, could facilitate the associated endothelial cell migration during the wound healing process [25, 41, 42]. Accordingly, we found that suppression of MMP14 leads to a significantly decreased rate of wound closure in HUVEC monolayers upon denudation (Supplementary Fig. 1a–d).

### Endothelial injury induces co-localization of MMP14 and endoglin and the release of soluble endoglin

The parallel increase in MMP14 and endoglin protein levels, as well as the enhanced MMP14 proteolytic activity observed during the wound healing process, prompted us to test whether MMP14 could target membrane endoglin to release its soluble form. Supporting this hypothesis, co-localization of MMP14 and endoglin in the plasma membrane of HUVECs under basal conditions and after 4 and 6 h of denudation was observed by confocal microscopy (Fig. 3a). In agreement with Fig. 2, an increased expression of both proteins was detected at 4–6 h after wounding, a time period associated with an active cellular migration. Immunostaining of MMP14 was observed in the membrane of those cells close to the edge of the wound. Some of these cells showed a clear co-localization of MMP14 and endoglin, as depicted in the merged images (yellow staining). Control staining in the absence of primary antibodies did not show any positive signal (data not shown), excluding a potential trapping of the immunofluorescent secondary antibodies, especially by the cell monolayer in the front of advance. In addition, a parallel distribution of MMP14 and

endoglin was found along a drawing line above the edge of the wound after 4 and 6 h of injury, whereas an irregular distribution was found in the resting condition of the confluent HUVEC monolayer (Fig. 3b). A scatter plot (cytofluorogram) analysis of both fluorescent signals also showed an increased co-localization area/area foreground (or total fluorescence area) at 4 h and 6 h after wounding with respect to time 0 (Fig. 3c, d). Moreover, suppression of KLF6 with siRNA led to a decrease in the MMP14 and endoglin co-localization rate after wounding associated with a marked decrease in their basal expression (Supplementary Fig. 2). Further support for the association between endoglin and MMP14 was provided by co-immunoprecipitation studies (Supplementary Fig. 3). Thus, endoglin was detected by Western blot analysis after immunoprecipitation with anti-MMP14 antibodies in HUVECs, and this endoglin signal was enhanced at 6 h after wounding or upon ectopic expression of KLF6 (Supplementary Fig. 3a). By contrast, the intensity of the MMP14-associated endoglin band was decreased upon silencing of KLF6 with siRNA (Supplementary Fig. 3b).

Next, we assessed whether the co-localization of MMP14 and endoglin was associated with an increased shedding of soluble endoglin. Indeed, levels of soluble endoglin were markedly increased in the culture medium of HUVEC monolayers at different time points after denudation, showing the maximum endoglin shedding at 8 h after wounding (Fig. 4a). Furthermore, suppression of MMP14 in HUVEC monolayers led to significantly decreased levels of soluble endoglin at 6 and 8 h after wounding compared to controls (Supplementary Fig. 1e, f). In agreement with a recent report [34], IL6 levels were also induced upon endothelial denudation, showing a similar kinetics as soluble endoglin (Fig. 4b).

### KLF6 upregulates expression of MMP14 after endothelial injury

KLF6 is a common transcription factor that is upregulated at the beginning of the activation phase in the endothelial injury model, as shown in Fig. 1c, in agreement with previous reports [34, 35]. This kinetics induction of KLF6 is compatible with the subsequent increase in MMP14 protein levels. To assess the effect of Klf6 suppression in vivo, MMP14 expression was studied in heterozygous *Klf6*<sup>+/-</sup> and wild-type mice, using a model of wire-induced endothelial injury. Four weeks after removal of the tunica intima (endothelial layer) from the hindlimb femoral artery, the presence of MMP14 was examined by immunohistochemistry (Fig. 5a, b; Supplementary Fig. 4). In uninjured vessels from wild-type and KLF6 heterozygous littermates, the presence of MMP14 was almost undetectable. By contrast, expression of MMP14 was

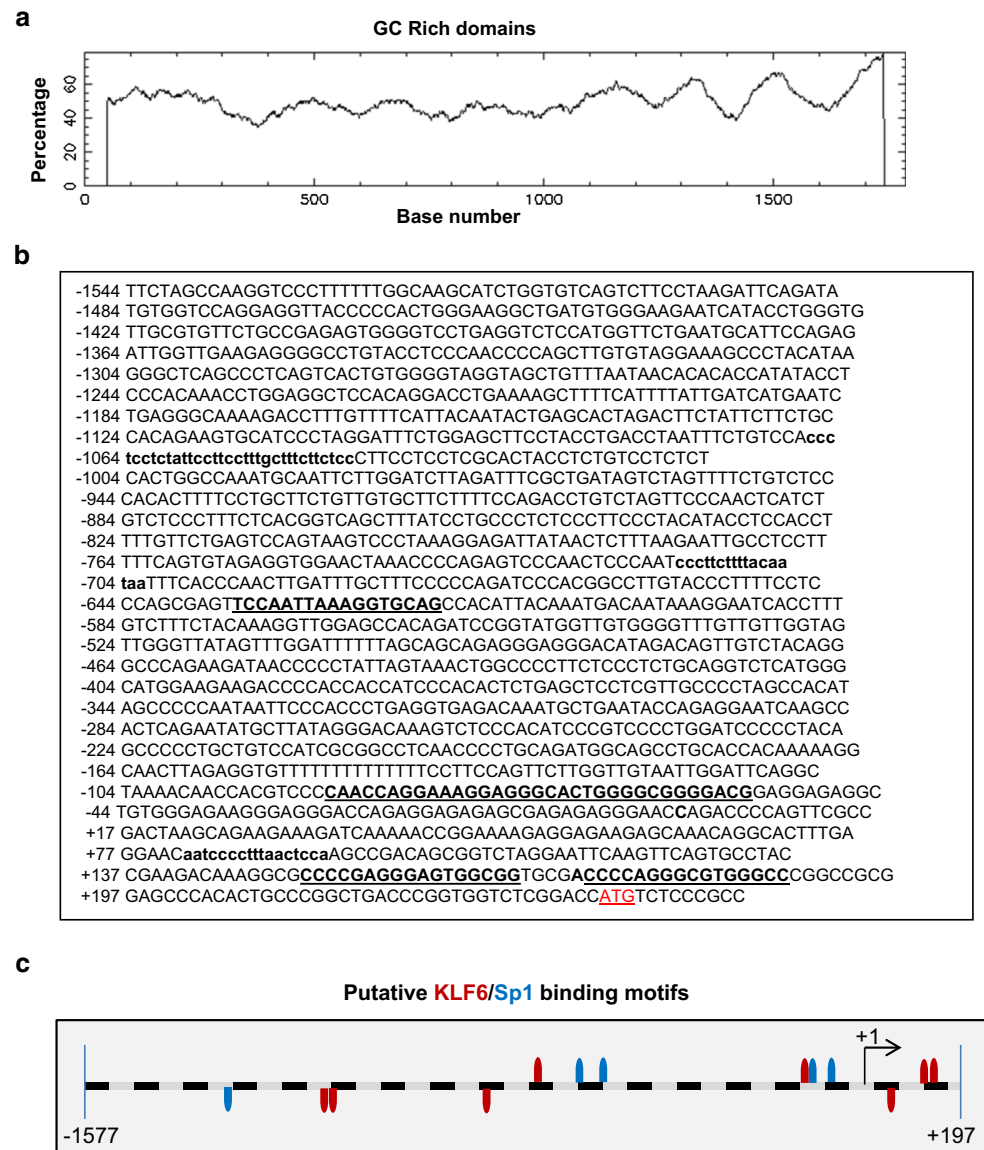
clearly increased after injury compared with uninjured femoral arteries of wild-type mice. On vascular injury, MMP14 was mainly localized in ECs of the hyperplastic neointima and in the thicker tunica media, composed mainly by vascular smooth muscle cells (vSMCs) (Fig. 5a). Interestingly, MMP14 staining in injured vessels of *Klf6*<sup>+/-</sup> mice was significantly decreased relative to control wild-type littermates (Fig. 5a, b). These results suggest that KLF6 regulates the expression of MMP14.

### MMP14 gene is a transcriptional target of KLF6

To assess whether MMP14 is a transcriptional target of KLF6, transient transfection experiments were performed in HEK293T cells (Fig. 5c, d). Ectopic expression of KLF6 led to a clear increase in the levels of endogenous MMP14 transcripts, as quantified by qRT-PCR (Fig. 5d). Also, the simultaneous overexpression of KLF6 and full length endoglin was associated with an increase in the levels of soluble endoglin (Fig. 5e). Furthermore, overexpression of KLF6 in HUVECs increased the levels of endogenous endoglin and MMP14 transcripts (Fig. 5f–h), as well as the amount of soluble endoglin under basal conditions and after endothelial denudation for 6 h (Fig. 5i). By contrast, suppression of KLF6 in HUVECs (Fig. 1d) decreased the levels of soluble endoglin induced during the wound healing process (Fig. 5j). These results suggest that the upregulated MMP14 proteolytically targets membrane endoglin releasing its soluble form to the culture media.

To analyze whether the MMP14 gene promoter contains putative binding motifs for KLF6, an in silico analysis of the proximal 5'-MMP14 promoter region with Genomatix MatInspector software was carried out (Fig. 6). All proteins of the KLF family are characterized by a highly conserved DNA binding domain, which preferentially recognizes sequences designated as Sp1 sites, i.e., “GC-box” or “CACCC elements” of diverse target genes [32]. We found several GC-rich domains along the -1444/+235 fragment of the MMP14 promoter (Fig. 6), and consensus motifs for KLF6 were identified at positions -1067, -1048, -718, -635, -86, -65, +83, +152 and +175 (Fig. 6b, c). Next, the physical interaction between KLF6 and the putative KLF6 binding motifs on the MMP14 promoter was examined by chromatin immunoprecipitation. HUVEC monolayers were subjected to endothelial denudation, and chromatin immunoprecipitation experiments were assayed using an anti-KLF6 antibody, both in control situation and after 3 h of endothelial denudation. KLF6-immunoprecipitated chromatin was subjected to polymerase chain reaction using different couples of primers, encompassing the four clusters of KLF6 motifs present in the MMP14 promoter sequence. As shown in Fig. 7a, KLF6 binding to MMP14 promoter was detected

**Fig. 6** *In silico* analysis of putative KLF6 binding motifs in the MMP14 promoter. **a** GC-rich domains in the MMP14 promoter fragment –1544/+247. The percentage of GC bases along the promoter is shown. Several GC-boxes that recruit members of the Sp1/KLF transcription factors family were identified. **b** Putative transcription factor binding motifs for KLF6 (**bold letters**) in the plus (*capitals*) and negative (*lowercase letters*) strands of human MMP14 5'-proximal promoter sequence are indicated. KLF6(+); klf6(–). The translation initiation codon is marked in *red*. The numbering of the nucleotides is referred to the predicted transcription initiation site (+1) identified by the Genomatix MatInspector software. **c** Potential KLF6 (*red*) and Sp1 (*blue*) binding sites on the MMP14 gene promoter as identified by the Genomatix MatInspector software

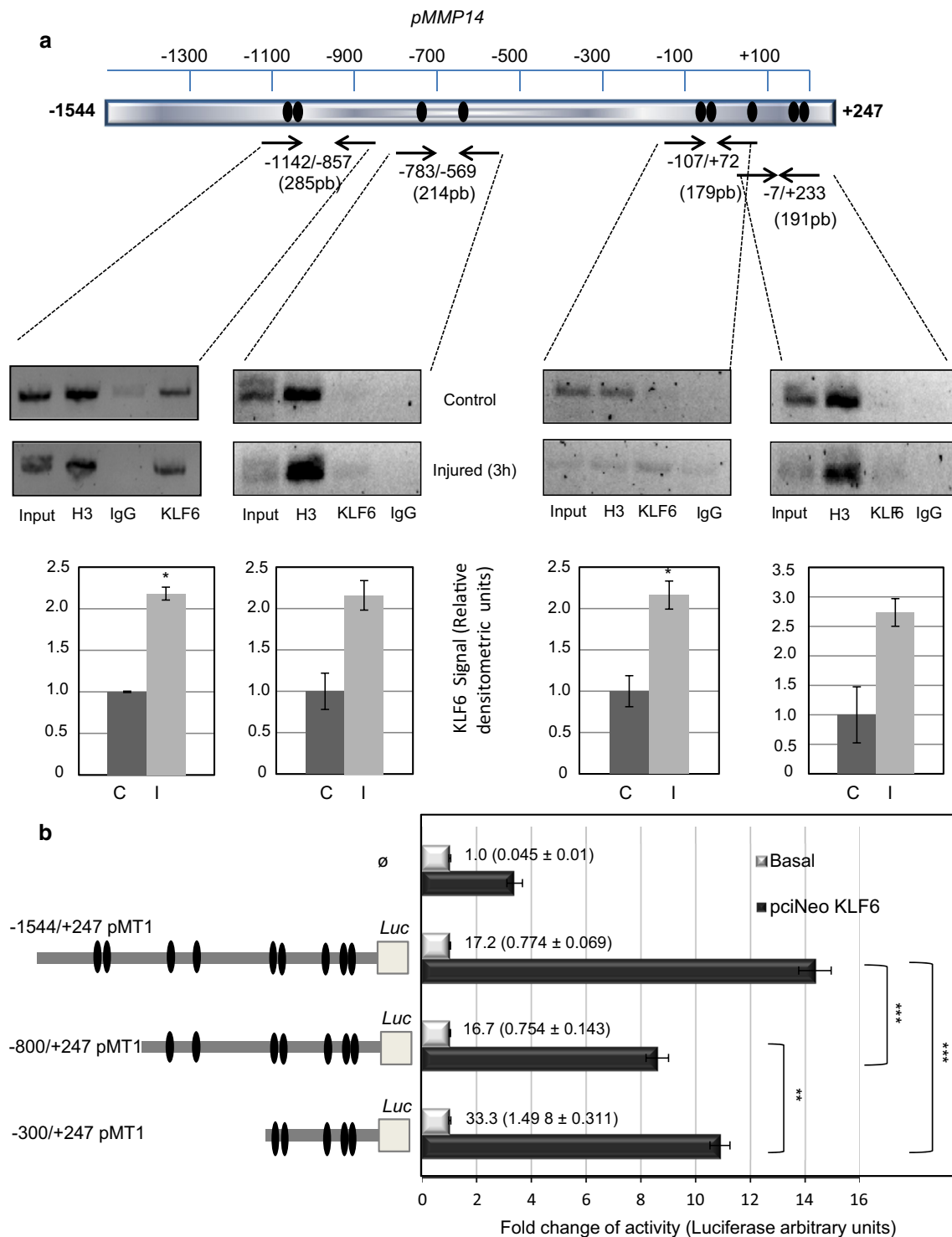


in the four amplified fragments (–1142/–857, –783/–569, –107/+72 and –7/+233) under basal conditions. Moreover, on endothelial wounding, the binding of KLF6 to MMP14 promoter was enhanced, as shown in the corresponding densitometric analysis (Fig. 7a). These results indicate that at least one KLF6 motif within each cluster is bound to the MMP14 promoter. To study the functional effect of this interaction, transcriptional experiments using MMP14 promoter (pMT1) constructs were performed. Transient co-transfections in HEK293T cells with three different luciferase-pMT1 deletion constructs, all of them including putative binding sites for KLF6 (–1544/+247; –800/+247; and –300/+247), showed a marked activation (~8–14-fold) upon KLF6 overexpression (Fig. 7b).

The highest stimulation (14-fold) was obtained with the longest construct (–1544/+247), which contains all the identified consensus KLF6 motifs. These results demonstrate that KLF6 is able to functionally interact with the proximal –1544/+247 fragment of the MMP14 promoter, stimulating its transcriptional activity.

## Discussion

An abnormal process of vascular remodeling may lead to pathological vascular lesions. Therefore, identification of molecular mediators implicated in the response to vascular injury is key to understand the mechanisms involved in



vascular repair. Accumulated evidence in recent years implicates the transcription factor KLF6 in orchestrating the gene expression response of ECs to vascular injury [31, 33]. Endothelial expression of KLF6 is upregulated upon vascular injury and is responsible for the transcriptional activation of several genes involved in vascular remodeling, including endoglin, ALK1, urokinase plasminogen

activator, collagen  $\alpha 1(I)$ , TGF- $\beta 1$  and TGF- $\beta$  receptor type I [34, 35, 38]. Here, we provide evidence supporting the inclusion of MMP14 in the list of vascular genes regulated by KLF6. Using in vitro and in vivo models, we show that MMP14 is upregulated at the surface of ECs after vascular injury. Following endothelial wound healing, we found a temporal relationship between MMP14 and KLF6 transcript

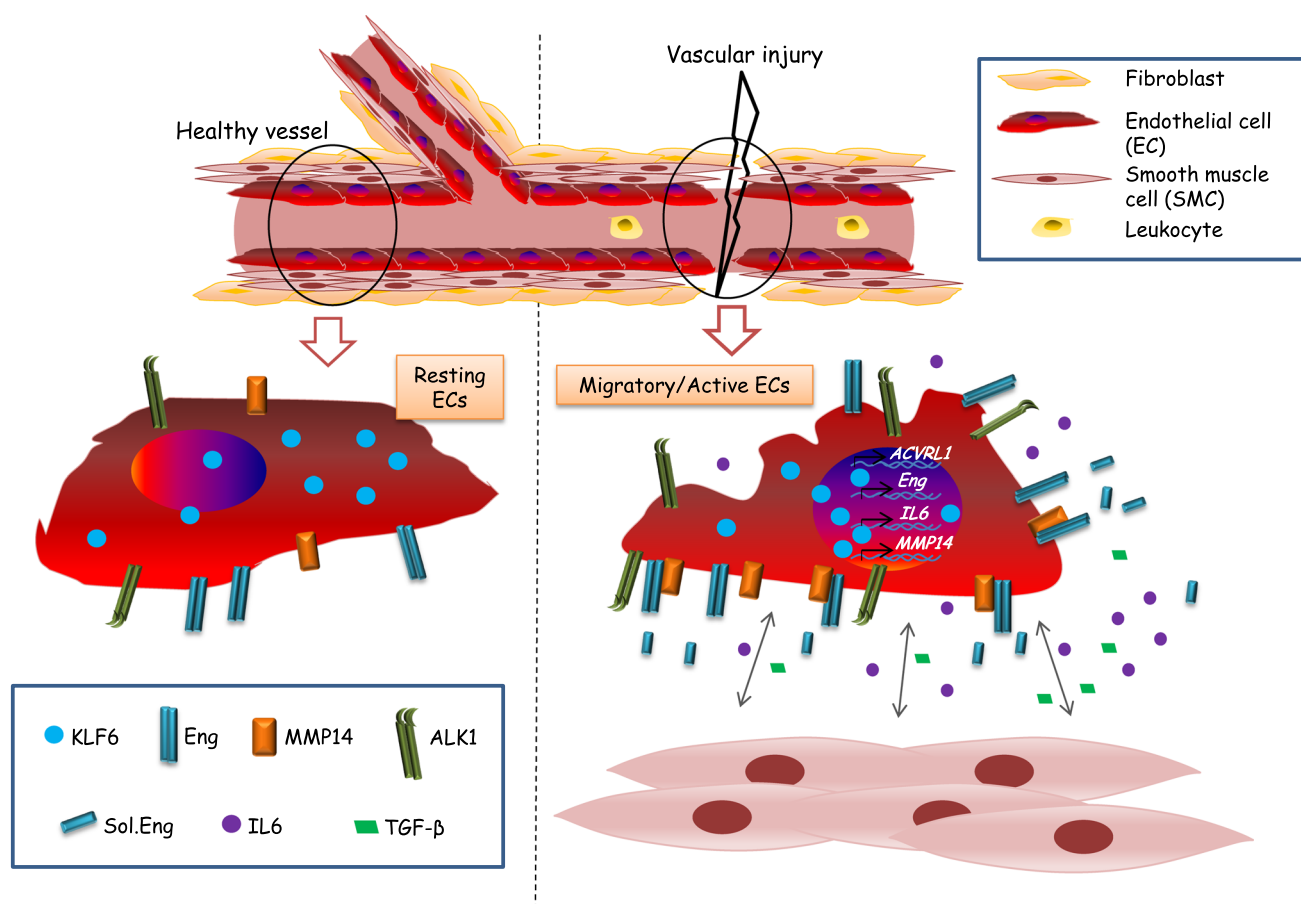


**Fig. 7** KLF6 interacts with MMP14 gene promoter and regulates its activity. **a** KLF6 interacts with MMP14 promoter in HUVECs. *In silico* analysis revealed the presence of potential KLF6-binding sites (black ovals) within GC-rich domains on MMP14 gene promoter using Genomatrix MatInspector software (scheme in upper panel). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments of KLF6 over the 5'-proximal MMP14 promoter were carried out in HUVECs comparing control condition and after 3 h of wound healing (middle panel). The chromatin was digested obtaining a 150–300-bp fragments-enrichment. Immunoprecipitation was carried out with anti-KLF6, anti-H3K4 (positive control) and non-immune (IgG) antibodies. PCRs were done with primers to detect four regions containing putative KLF6-sites in the promoter region of MMP14, using the total lysate as an input of the sample. KLF6 binding to the different pMMP14 regions from the ChIP experiment was measured by densitometry of the individual bands, and values of the (KLF6-IgG)/Input ratios were represented (bottom panel). Normalized ratios in basal conditions (C) and 3 h after the endothelial injury (I) are shown. **b** KLF6 transactivates the MMP14 promoter. *Left* 5'-deleted construct series of the MMP14 promoter cloned into pGL2-luc. The size of each construct compared with the size of the whole promoter construct is shown in the scheme. The drawing is not to scale. *Right* HEK293T was co-transfected with a luciferase reporter driven by different MMP14 promoter constructs in pGL2-luc (–1544/+247 pMT1; –800/+247 pMT1; and –300/+247 pMT1) which include different putative binding GC-rich motifs for KLF6, and the expression vector pCneo-KLF6. The pGL2-Luc empty vector (Ø) was used as a negative control. Overexpression of KLF6 upregulates between 8 and 14 times the activities of the MMP14 promoter constructs. The relative promoter activity under basal conditions is indicated in the corresponding bars, and the actual values of luciferase activity are shown in parenthesis. Transfection efficiency was corrected by relating luciferase activity to  $\beta$ -galactosidase activity. Results are expressed as a fold induction with respect to the basal activity of the corresponding constructs (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

upregulation that is compatible with a transcriptional involvement of KLF6 in MMP14 gene expression regulation. Supporting this observation, MMP14 protein levels are much lower in injured femoral arteries of *Klf6*<sup>+/-</sup> mice than those of wild-type animals. Also, suppression of KLF6 in cultured ECs decreases MMP14 expression and the subsequent release of soluble endoglin. Furthermore, ectopic expression of KLF6 is able to markedly transactivate the MMP14 gene promoter construct specifically designed and generated for this purpose. Previous reports have postulated that E2F and Ets families of transcription factors play a role in cancer through regulation of MMP14 gene promoter activity [43, 44]. In addition, transcription factors Egr-1, Sp1 and Sp3 are involved in the regulated expression of MMP14 in endothelial cells driven by hemodynamic forces and extracellular matrix contacts [45–47]. To our knowledge, this is the first study that analyzes the transcriptional activity of an MMP14 gene promoter construct in response to endothelial injury. Our results prompted us to explore the potential regulation by KLF6 of the MMP14 gene. An *in silico* analysis of the proximal MMP14 promoter sequence revealed the presence of nine putative consensus binding sites for KLF6 along the –1544/+247 pMT1 fragment. The

motifs are located at positions –1067, –1048, –718, –635, –86, –65, +83, +152 and +175. By chromatin immunoprecipitation, we demonstrate not only that KLF6 binds to four different KLF6 clusters (–1142/–857, –783/–569, –107/+72 and –7/+233) of the MMP14 promoter, but we also show that this binding is increased on endothelial injury *in vitro*. This finding agrees with the functional effect of KLF6 in transcriptional experiments using several MMP14 promoter constructs. Indeed, all constructs, including putative binding sites for KLF6 (–1544/+247; –800/+247; and –300/+247), showed a marked activation upon ectopic expression of KLF6. Together, these results demonstrate that KLF6 is able to functionally interact with the MMP14 promoter, stimulating its transcriptional activity. Importantly, many of the KLF6 motifs in the proximal MMP14 promoter are located at GC-rich regions where they overlap, or are surrounded by, consensus binding sites for the transcription factor Sp1 (Fig. 6). The physical proximity between KLF6 and Sp1 motifs suggests a synergistic collaboration of both transcription factors in the transcriptional machinery complex of MMP14. Supporting this interpretation, we have previously demonstrated the direct physical interaction and functional cooperation between Sp1 and KLF6 on endoglin and ALK1 gene promoters, in response to vascular injury [34, 35, 48].

Here, we report for the first time that endothelial denudation *in vitro* leads to an increase in soluble endoglin levels. Interestingly, MMP14 co-localizes with and targets membrane-bound endoglin to proteolytically release soluble endoglin. Overall, the functional link between MMP14 and endoglin in their parallel gene expression in response to endothelial damage supports their coordinated involvement in the molecular events triggered by a vascular injury to recover the endothelial homeostasis. While the role of MMP14 in vascular remodeling and the cellular processes involved has been previously described [17, 49–51], little is known about the role of soluble endoglin in this specific setting. Circulating levels of soluble endoglin are elevated in preeclampsia, hypercholesterolemia, diabetes, atherosclerosis, severe pulmonary arterial hypertension, acute myocardial infarction and some types of solid cancers [27–29, 52–54]. Of note, many of these pathologies are associated with cardiovascular damage. At variance with the pro-angiogenic role of membrane-bound endoglin, soluble endoglin displays an anti-angiogenic activity [25, 27, 30], which has been postulated as a pathogenic contributor in preeclampsia [27]. In the context of cardiovascular repair after injury, active angiogenesis and endothelial cell proliferation are expected to occur in order to reestablish the proper circulation in the tissues. KLF6, an upstream trigger of soluble endoglin, is strongly expressed in ECs of highly vascularized tissues such as placenta and lung, and promotes vascular remodeling [31]. Thus, it is



**Fig. 8** Hypothetical model of KLF6 regulation during vascular injury. Upon vascular injury, KLF6 translocates from the cytoplasm to the nucleus and activates endothelial genes such as endoglin [35], ALK1 [34], IL6 [34] and MMP14 (this report). Endoglin and MMP14

intriguing the role of the anti-angiogenic activity associated with soluble endoglin during the vascular repair process. Probably, the release of soluble endoglin constitutes an early response to vascular damage that halts angiogenesis, followed by a second phase involving the upregulation of membrane-bound endoglin and active angiogenesis [6, 35, 55]. In this regard, the release of soluble endoglin may have important consequences at the cellular level as it is associated with the decrease in the surface endoglin, which may lead to the downregulation of the ALK1/endoglin-dependent signaling pathway, a route that in ECs promotes angiogenesis [6, 36]. Further studies are necessary to elucidate the exact role of soluble endoglin, and the associated downregulation of membrane-bound endoglin, on the vascular repair process.

Although we have focused our MMP14 studies on its endothelial expression and function, MMP14 can be expressed by other cell types including vSMCs [49, 50]. This is in agreement with the expression of MMP14 in the layer of vSMCs surrounding the tunica intima after endothelial denudation of the femoral artery as seen in Fig. 5a. Of note,

co-localize at the cell surface. Then, MMP14 triggers the release of soluble endoglin. Soluble proteins such as IL6, endoglin and TGF-β are potential players in the cross-talk between ECs and vSMCs during wound healing

vSMCs can also express the MMP14 substrate endoglin in pathological vessels [56]. At variance with ECs, vSMCs are not directly injured in this animal model. Thus, a cross-talk between endothelial and smooth muscle cell layers appears necessary to explain the upregulated expression of MMP14 in vSMCs on vascular injury. In this line, an increase in IL-6 along the in vitro wounding process of ECs has been reported [34]. Moreover, KLF6 regulates the transcriptional activity of IL6 gene, suggesting that IL6 is a putative candidate to contribute to the paracrine effect on vSMCs surrounding the endothelium [34]. Supporting the involvement of IL6 in the vascular repair process is the finding that IL-6 KO mice take three times longer to heal than wild-type animals [57]. Thus, it can be postulated that the release of soluble factors, such as IL-6, from the injured endothelium would serve to expand the repair signal from the inner to the more distant layers of the vessel. This coordinated cross-talk between vSMCs and ECs [50] and the upregulated expression of MMP14 in vSMCs upon vascular damage are in agreement with the critical role that vSMCs play during pathologic vascular remodeling. Thus, VSMCs embedded within the collagen-

rich matrix of the artery wall mobilize and activate MMP14 to degrade and infiltrate 3D barriers of interstitial collagen, including the arterial wall. In fact, genetic deletion of MMP14 affords mice with a protected status against neointimal hyperplasia and lumen narrowing in vivo [49].

In summary, our studies demonstrate for the first time a functional relationship between the transcription factor KLF6 and MMP14 expression (Fig. 8). Also, after vascular injury, KLF6 is responsible for the increased expression of membrane endoglin in endothelial cells and the subsequent MMP14-dependent release of soluble endoglin. The levels of IL6, a proangiogenic and proinflammatory cytokine, are also increased, as a consequence of KLF6 activation. Both IL6 and soluble endoglin could contribute to the cross-talk between ECs and vSMCs, which is involved in the mechanism of wound healing. Overall, these results suggest that KLF6 is a master regulator during vascular injury, repair and migration, and can play a role in physiological and pathological processes of the blood vessels.

**Acknowledgments** We thank Drs. Eva Garrido-Martin and Alicia Garcia Arroyo for helpful comments and Carmen Langa for excellent technical assistance. This study was funded by grants from *Ministerio de Economía y Competitividad* of Spain (SAF2013-43421-R to CB and SAF2011-23475 to LMB), *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras* (CIBERER; ISCIII-CB06/07/0038 and ER16PIAC707 to CB), *Red de Investigación Cooperativa en Salud* (RD12/0042/0006 to MR), National Institutes of Health (NIH; DK37340 and DK56621 to SLF) and FEDER funds. CIBERER is an initiative of the *Instituto de Salud Carlos III* (ISCIII) of Spain.

# Compliance with ethical standards

**Ethical approval** All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

# References

- Santibáñez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011) TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 121(6):233–251. doi:10.1042/CS20110086
- ten Dijke P, Arthur HM (2007) Extracellular control of TGF- $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11):857–869. doi:10.1038/nrm2262
- Shovlin CL (2010) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 24(6):203–219. doi:10.1016/j.blre.2010.07.001

- McDonald J, Wooderchak-Donahue W, Webb C CV, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P (2015) Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* 6:1. doi:10.3389/fgene.2015.00001
- Bernabeu C, Conley BA, Vary CP (2007) Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem* 102(6):1375–1388. doi:10.1002/jcb.21594
- López-Novoa JM, Bernabeu C (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(4):H959–H974. doi:10.1152/ajpheart.01251
- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104(10):1343–1351. doi:10.1172/JCI8088
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R et al (2000) Endoglin, an ancillary TGF $\beta$  receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217(1):42–53. doi:10.1006/dbio.1999.9534
- ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11(1):79–89. doi:10.1007/s10456-008-9101-9
- Davis GE, Senger DR (2005) Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97(11):1093–1107. doi:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
- Rundhaug JE (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9(2):267–285. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x
- Mott JD, Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16(5):558–564. doi:10.1016/j.ccb.2004.07.010
- Yang Y, Rosenberg GA (2015) Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res* 1623:30–38. doi:10.1016/j.brainres.2015.04.024
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):221–233. doi:10.1038/nrm2125
- Wang M, Kim SH, Monticone RE, Lakatta EG (2015) Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension* 65(4):698–703. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03618
- Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998) Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273(6):3604–3610. doi:10.1074/jbc.273.6.3604
- Kozioł A, Gonzalo P, Mota A, Pollán Á, Lorenzo C, Colomé N, Montaner D, Dopazo J, Arribas J, Canals F, Arroyo AG (2012) The protease MT1-MMP drives a combinatorial proteolytic program in activated endothelial cells. *FASEB J* 26(11):4481–4494. doi:10.1096/fj.12-205906
- Ray BK, Shakyia A, Turk JR, Apte SS, Ray A (2004) Induction of the MMP-14 gene in macrophages of the atherosclerotic plaque: role of SAF-1 in the induction process. *Circ Res* 95(11):1082–1090. doi:10.1161/01.RES.0000150046.48115.80
- Li C, Jin XP, Zhu M, Chen QL, Wang F, Hu XF, Wang WF et al (2014) Positive association of MMP 14 gene polymorphism with vulnerable carotid plaque formation in a Han Chinese population. *Scand J Clin Lab Invest* 74(3):248–253. doi:10.3109/0036513.2013.879731
- Johnson JL, Jenkins NP, Huang WC, Di Gregoli K, Sala-Newby GB, Scholtes VP, Moll FL et al (2014) Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. *Mediators Inflamm* 2014:276457. doi:10.1155/2014/276457

21. Ding BS, Gomi K, Rafii S, Crystal RG, Walters MS (2015) Endothelial MMP14 is required for endothelial-dependent growth support of human airway basal cells. *J Cell Sci* 128(16):2983–2988. doi:[10.1242/jcs.168179](https://doi.org/10.1242/jcs.168179)
22. Roy S, Patel D, Khanna S, Gordillo GM, Biswas S, Friedman A, Sen CK (2007) Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(36):14472–14477. doi:[10.1073/pnas.0706793104](https://doi.org/10.1073/pnas.0706793104)
23. van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4):716–728. doi:[10.1161/01.ATV.000029518.58252.17](https://doi.org/10.1161/01.ATV.000029518.58252.17)
24. Lu H, Hu L, Yu L, Wang X, Urvalek AM, Li T, Shen C, Mukherjee D, Lahiri SK, Wason MS, Zhao J (2014) KLF8 and FAK cooperatively enrich the active MMP14 on the cell surface required for the metastatic progression of breast cancer. *Oncogene* 33(22):2909–2917. doi:[10.1038/onc.2013.247](https://doi.org/10.1038/onc.2013.247)
25. Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P (2010) Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70(10):4141–4150. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-09-4466](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4466)
26. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujó B, Langa C, Gonzalez-Núñez M, Llano E, Pendas AM, Díaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* 126(22):2612–2624. doi:[10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101261](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101261)
27. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12(6):642–649. doi:[10.1038/nm1429](https://doi.org/10.1038/nm1429)
28. Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M (2014) Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta* 35(Suppl):S93–S99. doi:[10.1016/j.placenta.2013.10.020](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.020)
29. Oujó B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2013) Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Curr Mol Med* 13(8):1345–1357
30. Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R, Grinberg AV (2011) Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem* 286(34):30034–30046. doi:[10.1074/jbc.M111.260133](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260133)
31. McConnell BB, Yang VW (2010) Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* 90(4):1337–1381. doi:[10.1152/physrev.00058.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2009)
32. Andreoli V, Gehrau RC, Bocco JL (2010) Biology of Krüppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death. *IUBMB Life* 62(12):896–905. doi:[10.1002/iub.396](https://doi.org/10.1002/iub.396)
33. Atkins GB, Jain MK (2007) Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res* 100(12):1686–1695. doi:[10.1161/01.RES.0000267856.00713.0a](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000267856.00713.0a)
34. Garrido-Martín EM, Blanco FJ, Roquè M, Novensà L, Tarocchi M, Lang UE, Suzuki T, Friedman SL, Botella LM, Bernabéu C (2013) Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene. *Circ Res* 112(1):113–127. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.112.275586](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.275586)
35. Botella LM, Sánchez-Elsner T, Sanz-Rodríguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratzu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S, Bernabéu C (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100(12):4001–4010. doi:[10.1182/blood.V100.12.4001](https://doi.org/10.1182/blood.V100.12.4001)
36. Mahmoud M, Upton PD, Arthur HM (2011) Angiogenesis regulation by TGFβ signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochem Soc Trans* 39(6):1659–1666. doi:[10.1042/BST20110664](https://doi.org/10.1042/BST20110664)
37. Kim Y, Ratzu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL (1998) Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 273(50):33750–33758. doi:[10.1074/jbc.273.50.33750](https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33750)
38. Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL (2000) Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood* 95(4):1309–1316
39. Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL (2006) Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood* 107(4):1357–1365. doi:[10.1182/blood-2005-05-1916](https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1916)
40. Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED (2000) Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2):335–342. doi:[10.1161/01.ATV.20.2.335](https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.2.335)
41. Arroyo AG, Iruela-Arispe ML (2010) Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res* 86(2):226–235. doi:[10.1093/cvr/cvq049](https://doi.org/10.1093/cvr/cvq049)
42. Itoh Y, Seiki M (2006) MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206(1):1–8. doi:[10.1002/jcp.20431](https://doi.org/10.1002/jcp.20431)
43. Izumiya Y, Ohiro Y, Higashino F, Yoshida K, Taguchi K, Todo S, Kohgo T, Totsuka Y, Shindoh M (2005) E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters. *Oncol Rep* 13(4):715–720. doi:[10.3892/or.13.4.715](https://doi.org/10.3892/or.13.4.715)
44. Johnson JL, Pillai S, Pernazza D, Sebt SM, Lawrence NJ, Chellappan SP (2012) Regulation of matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease. *Cancer Res* 72(2):516–526. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-11-2647](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2647)
45. Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA (1999) Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 274(32):22679–22685. doi:[10.1074/jbc.274.32.22679](https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22679)
46. Yun S, Dardik A, Haga M, Yamashita A, Yamaguchi S, Koh Y, Madri JA, Sumpio BE (2002) Transcription factor Sp1 phosphorylation induced by shear stress inhibits membrane type 1-matrix metalloproteinase expression in endothelium. *J Biol Chem* 277(38):34808–34814. doi:[10.1074/jbc.M205417200](https://doi.org/10.1074/jbc.M205417200)
47. Yamaguchi S, Yamaguchi M, Yatsuyanagi E, Yun SS, Nakajima N, Madri JA, Sumpio BE (2002) Cyclic strain stimulates early growth response gene product 1-mediated expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *Lab Invest* 82(7):949–956
48. Garrido-Martín EM, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee UE, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C (2010) Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol* 11:51. doi:[10.1186/1471-2199-11-51](https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-51)
49. Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F,



- Allen ED, Weiss SJ (2005) MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 202(5):663–671. doi:[10.1084/jem.20050607](https://doi.org/10.1084/jem.20050607)
50. Yana I, Sagara H, Takaki S, Takatsu K, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Taniguchi S, Aoki T, Sato H, Weiss SJ, Seiki M (2007) Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci* 120(Pt 9):1607–1614. doi:[10.1242/jcs.000679](https://doi.org/10.1242/jcs.000679)
51. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L (2013) Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm* 2013:928315. doi:[10.1155/2013/928315](https://doi.org/10.1155/2013/928315)
52. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M (2009) The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1792(10):954–973. doi:[10.1016/j.bbadis.2009.07.003](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.003)
53. Blázquez-Medela AM, García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JJ, Sánchez-Rodríguez A, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8:86. doi:[10.1186/1741-7015-8-86](https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-86)
54. Ikemoto T, Hojo Y, Kondo H, Takahashi N, Hirose M, Nishimura Y, Katsuki T, Shimada K, Kario K (2012) Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels* 27(4):344–351. doi:[10.1007/s00380-011-0163-z](https://doi.org/10.1007/s00380-011-0163-z)
55. Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM (2002) Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res* 51(9):464–470
56. Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153(2):323–335. doi:[10.1016/S0021-9150\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00422-6)
57. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Guriel JL, Sugawara T, Luster MI (2000) Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J* 14(15):2525–2531. doi:[10.1096/fj.00-0073com](https://doi.org/10.1096/fj.00-0073com)

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### TRANSCRIPTION FACTOR KLF6 UPREGULATES EXPRESSION OF METALLOPROTEASE MMP14 AND SUBSEQUENT RELEASE OF SOLUBLE ENDOGLIN DURING VASCULAR INJURY

Eunate Gallardo-Vara<sup>1</sup>, Francisco J. Blanco<sup>1</sup>, Mercè Roqué<sup>2</sup>, Scott L. Friedman<sup>3</sup>, Toru Suzuki<sup>4</sup>, Luisa  
M. Botella<sup>1</sup>, Carmelo Bernabeu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, and Centro de Investigación Biomédica en Red de  
Enfermedades Raras (CIBERER), 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servei de Cardiologia, Hospital Clínic i Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer,  
Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Division of Liver Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

<sup>4</sup>Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, Leicester, UK, National Institute for  
Health Research Leicester Cardiovascular Biomedical Research Unit, Glenfield Hospital, Leicester,  
UK

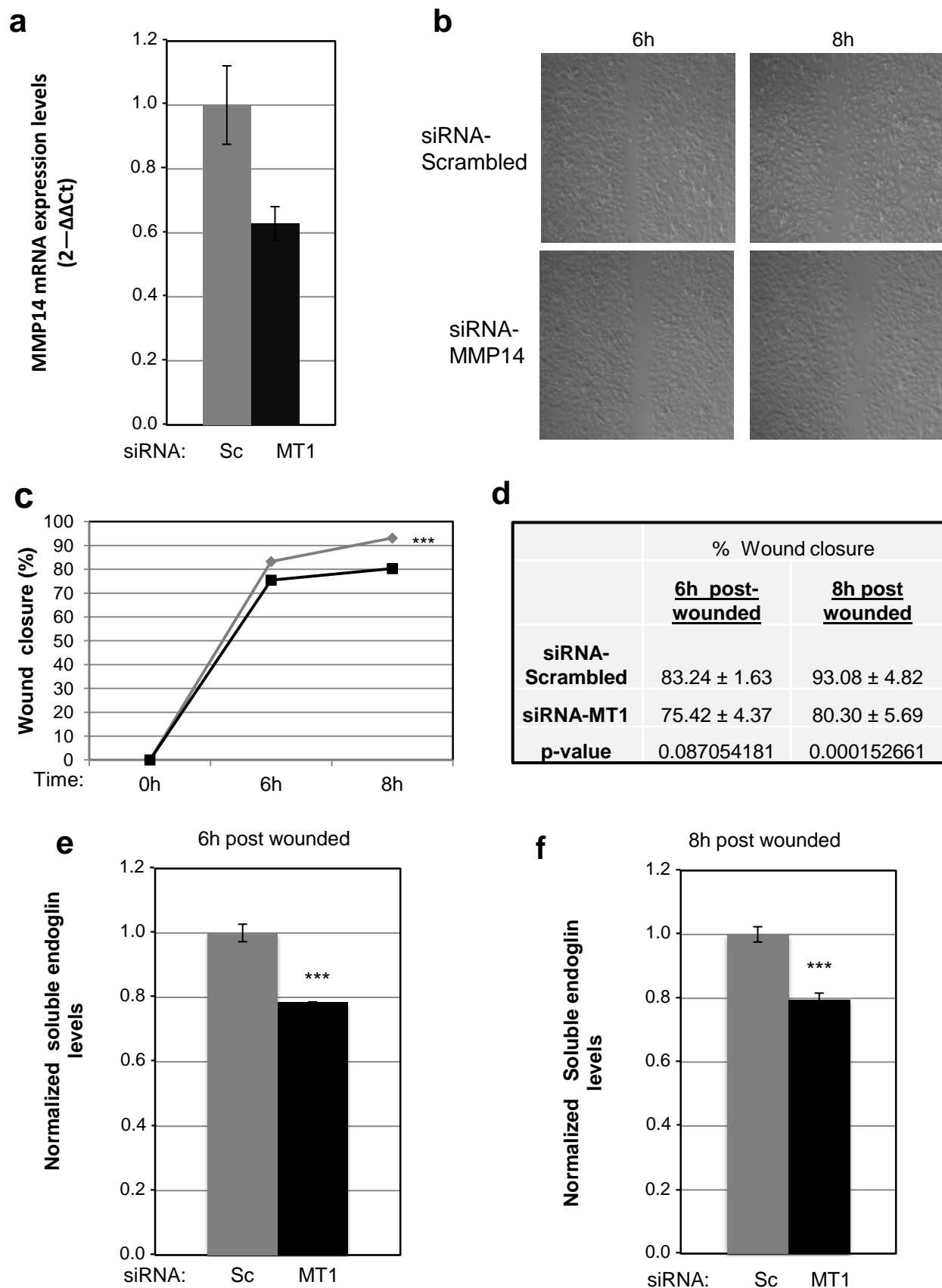
\*Corresponding author: Carmelo Bernabeu, Centro de Investigaciones Biologicas, c/ Ramiro de  
Maeztu 9, Madrid 28040, Spain; Phone: 34-918373112 x 4246; E-mail: bernabeu.c@cib.csic.es

**Supplementary Fig. 1. Silencing of MMP14 expression in HUVECs decreases cell migration and soluble endoglin release during wound healing.** HUVECs were nucleofected with a mix of three different siRNA-MMP14 [NM\_004995, Sigma] (siRNA-MT1) or Scrambled siRNA [Universal negative control SIC001, Sigma] (Sc), the nucleofection efficiency being ~40%. After nucleofection, the levels of MMP14 transcripts were measured by quantitative RT-PCR (a). Monolayers of nucleofected HUVECs were wounded *in vitro*, leaving approximately 40% intact of total monolayer. Photographs (5X) were taken at different times after wounding (b) and the percentage of wound closure (c,d) and the levels of soluble endoglin (e,f) were measured at 6h and 8h. Suppression of MMP14 significantly decreases the migration phenotype and the release of soluble endoglin (\*\*\*) $p < 0.001$  respect to scrambled siRNA condition).

**Supplementary Fig. 2. Effect of KLF6 suppression on MMP14 and endoglin colocalization.** KLF6 suppression was carried out by nucleofection in HUVECs with siRNA specific for KLF6 (siKLF6), using scrambled siRNA as a control. After forty eight hours, HUVEC monolayers were wounded *in vitro* and the presence of MMP14 and endoglin was detected by immunofluorescence at the indicated time points. Cells were incubated with a mouse antibody anti-endoglin (P4A4) or a rabbit antibody anti-MMP14, followed by a secondary anti-mouse IgG coupled to Alexa 488 (green staining) or a secondary anti-rabbit IgG coupled to Alexa 647 (red staining). (a) Single stainings and merge images plus DAPI (nuclear staining in blue) are shown at the indicated magnification (63x). Colocalization of MMP14 and endoglin is visualized by the yellow color. (b-d) Quantification studies. (b) Representative merge images showing the colocalization of MMP14 and endoglin with white dots (first row) and the corresponding cytofluorograms (second row). (c) Quantification of MMP14 and endoglin colocalization (percentage) obtained from the cytofluorograms. (d) Quantification of endoglin and MMP14 expression relative to nuclei staining with DAPI. This is a representative experiment of 3 different ones.

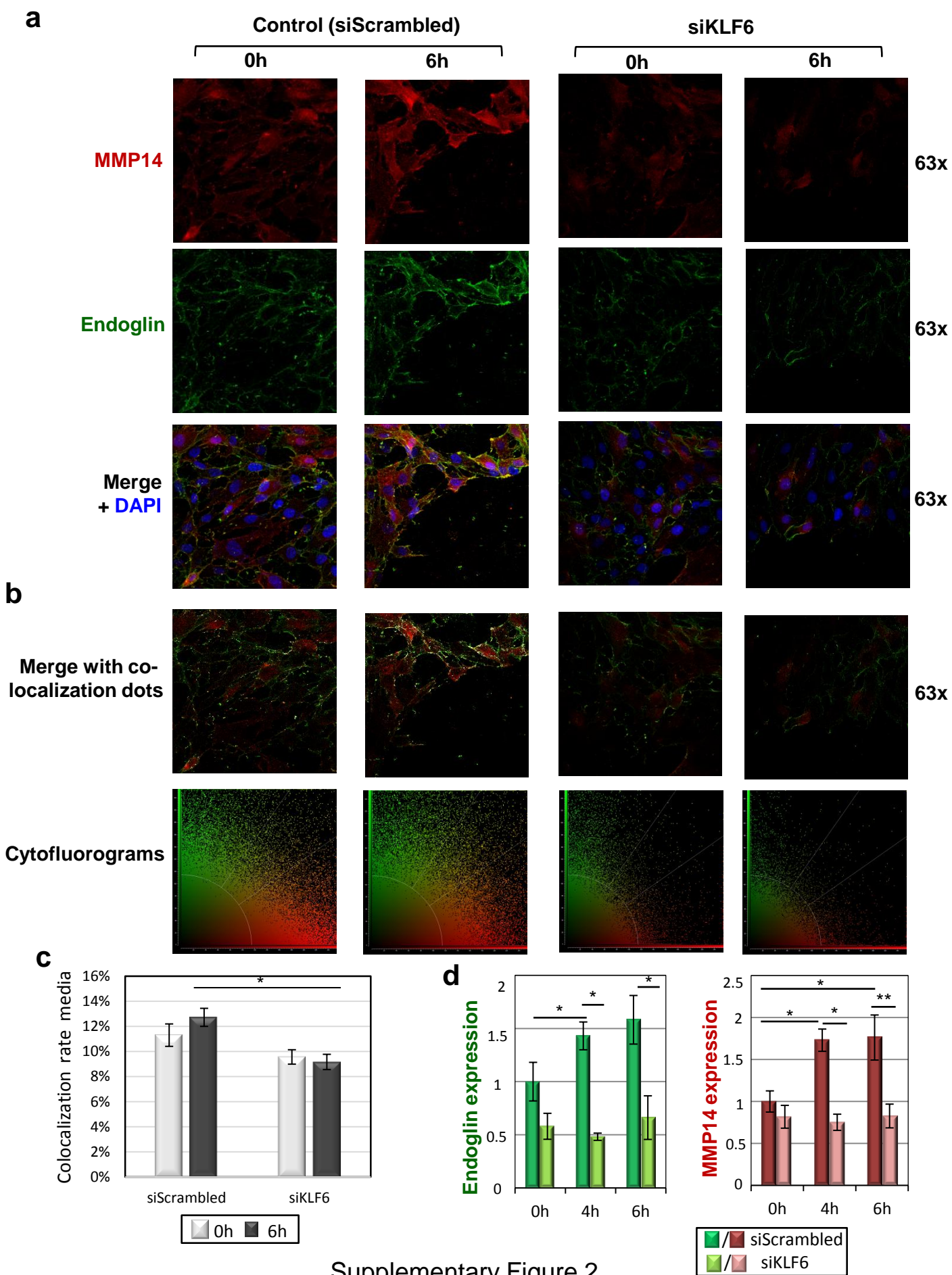
**Supplementary Fig. 3. Coimmunoprecipitation of endoglin and MMP14.** HUVECs were wounded *in vitro* and lysed at times 0h and 6h. When necessary, HUVECs were nucleofected 48 hours before wounding. HUVEC were lysed with lysis solution (1% NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5 mM NaF, 1 mM PMSF and protease and phosphatase inhibitors). Total cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-MMP14 monoclonal antibody (1:80 dilution, #ab51074, Abcam) coupled to Protein G magnetic beads (Millipore). Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE on 8% acrylamide gels under reducing conditions and electrotransferred to a nitrocellulose membrane. Western Blot (WB) analysis was carried out using the P4A4 mouse monoclonal antibody to endoglin and a secondary antibody conjugated to Horse Radish Peroxidase (HRP). The membranes were developed with Supersignal west Pico-chemiluminescent substrate (Pierce) to enhance HRP luminescence, following the manufacturer's instructions. Quantification of the bands intensity was measured by Quantity one software (Bio-Rad, Chicago, IL). A negative control (NC) with an IgG matched antibody (instead of anti-MMP14) is included. The molecular weight markers (M) are in the last lane on the right. Representative blots are shown on the left, whereas the normalized intensity of the endoglin bands is shown in the right histograms. (a) HUVECs were nucleofected with the KLF6 expression vector pciNeoKLF6 or the corresponding empty vector, as indicated. (b) HUVECs were nucleofected with the siRNA specific for KLF6 (siKLF6) or an scrambled siRNA (siScrambled), as indicated.

**Supplementary Fig. 4. Negative control for immunohistochemical staining of MMP14 in mouse femoral arteries.** Tissue samples were processed for immunochemistry as in Fig. 5a, but in the absence of primary antibody. Pictures were taken at  $\times 50$  magnification.

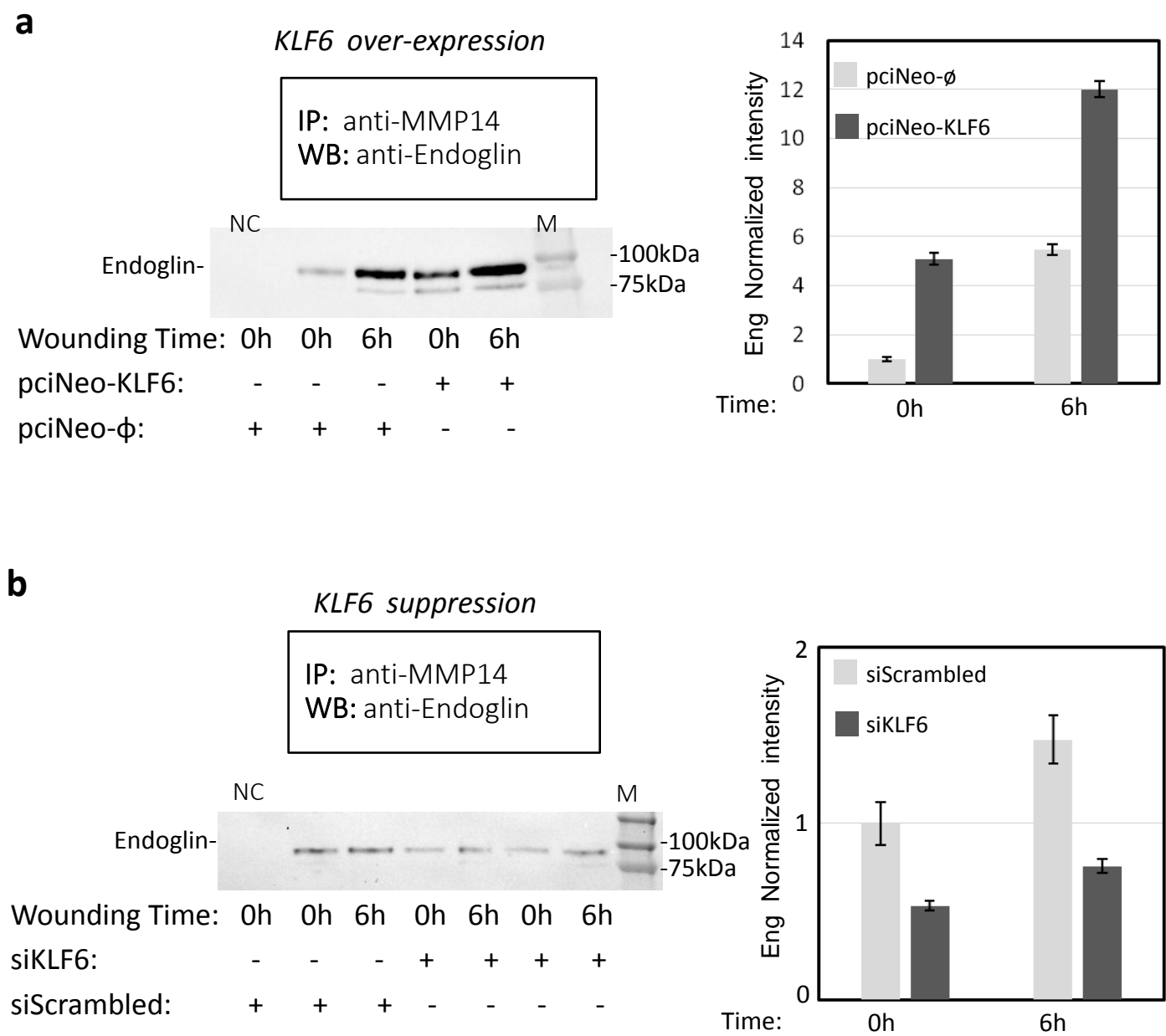


Supplementary Figure 1

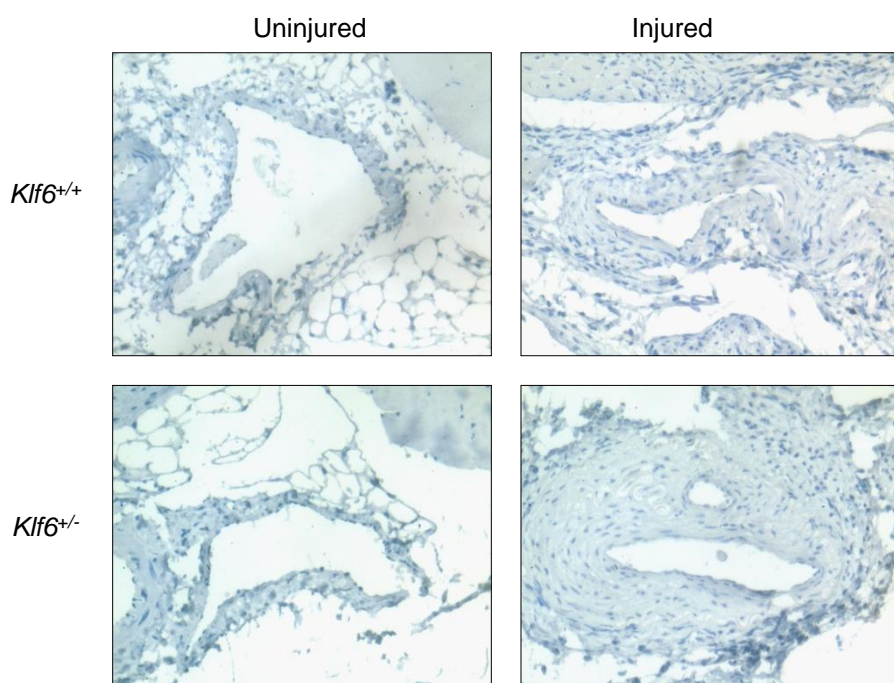




Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4